

Papazoglu, Gabriela Magalí

Desórdenes congénitos de la glicosilación (CDG): búsqueda de variantes génicas y alteraciones glicoproteicas en pacientes argentinos

**Tesis para la obtención del título de posgrado de
Doctora en Bioquímica**

Directora: Asteggiano, Carla Gabriela

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.



Esta obra está bajo licencia 2.5 de Creative Commons Argentina.
Atribución-No comercial-Sin obras derivadas 2.5

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Químicas



**“Desórdenes Congénitos de la Glicosilación (CDG):
Búsqueda de variantes génicas y alteraciones
glicoproteicas en pacientes argentinos”**

Tesis de la Facultad de Ciencias Químicas
de la Universidad Católica de Córdoba conforme
a los requisitos para obtener el título de Doctor en Bioquímica

Por

Gabriela Magali Papazoglu

Córdoba

2020

Directora de Tesis

Dra. Carla Gabriela Asteggiano (PhD)

Investigadora Independiente CONICET - Centro de Estudio de las Metabolopatías
Congénitas (CEMECO - UNC), Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de
Córdoba
Facultad Ciencias de la Salud, Carrera Medicina, Universidad Católica de Córdoba

Comisión de Trabajo Final

Dra. Cecilia Carpinella (PhD)

Instituto de Investigaciones en Recursos Naturales y Sustentabilidad José Sánchez
Labrador S.J., Universidad Católica de Córdoba.(IRNASUS-CONICET), Facultad
de Química, Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Dr. Néstor Soria (PhD)

Cátedra de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Unidad Asociada al
CONICET: Área de Cs. Agrarias, Ingeniería, Cs. Biológicas, Universidad Católica
de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Dr. Pablo Gargantini (PhD)

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad
Católica de Córdoba, Argentina; Centro de Investigación y Desarrollo en
Inmunología y Enfermedades Infecciosas (CIDIE-CONICET).

Dr. Rodolfo Rey (PhD)

Centro de Investigaciones Endocrinológicas “Dr. César Bergadá” (CEDIE)
CONICET-FEI-División de Endocrinología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.
Buenos Aires, Argentina

DEDICATORIA

A Mariano, por ser mi compañero incondicional. Tu ayuda en este proceso fue fundamental, gracias por acompañarme, apoyarme y motivarme siempre a mas, sobre todo en los momentos más turbulentos. Gracias por tu amor incondicional y paciencia.

A Max, por acompañarme desde el útero durante estos siete meses de escritura y ser el motor para finalizar esta etapa.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos años tuve el agrado de conocer y compartir con muchos profesionales que aportaron a mi formación académica y profesional, a todos ellos muchísimas gracias por sus aportes y por contribuir a que este trabajo sea posible.

También quiero agradecer a todas esas hermosas personas que me acompañaron en el plano personal en este proceso que no resultó para nada fácil. Sobre todo, a quienes estuvieron y supieron darme palabras de aliento y contención en los momentos complicados. Tuve la suerte de conocer personas maravillosas y sin dudas nada hubiese sido igual sin su ayuda.

Índice General

Abreviaturas.....	iv
Índice de tablas	viii
Indice de figuras	ix
Resumen.....	xi
Summary	xiii
Estructura de la tesis	xv
INTRODUCCIÓN	- 1 -
1.0 Errores Innatos del Metabolismo (EIM)	- 2 -
1.1 Glicosilación celular y Desórdenes Congénitos de la Glicosilación en seres humanos	- 2 -
1.2 N-Glicosilación.....	27
1.2.1 Formación de N-glicoconjugados	27
1.3 Desórdenes Congénitos de la N-glicosilación	29
1.3.1 Bases moleculares de la patología	29
1.3.2 Presentación clínica.....	30
1.3.2.1 PMM2-CDG.....	30
1.3.2.2 ALG2-CDG	32
1.4 Detección y caracterización de pacientes CDG	32
1.4.1 Screening Bioquímico	32
1.4.2 Diagnóstico Genético	35
1.4.2.1 Secuenciación de Sanger de Genes Candidatos	35
1.4.2.2 Secuenciación masiva de genes (NGS).....	35
Fragmentación del ADN y formación de la librería	36
Enriquecimiento de la librería y amplificación	36
Secuenciación	36
Procesamiento de datos y parámetros de calidad.....	37
OBJETIVOS	40
Objetivo General	41
Objetivos Específicos	41
MATERIALES Y MÉTODOS	42
Materiales	43
Inclusión de sujetos al estudio.....	43
Criterios de inclusión y exclusión de pacientes al estudio.....	43
Obtención, procesamiento y conservación de muestras biológicas	44
Obtención del plasma rico en plaquetas (PRP).....	44
Metodología.....	45
1.0 Análisis de isoformas N-glicosiladas de proteínas séricas.....	45

1.1 Isoelectroenfocado de Transferrina.....	45
1.1.2 Detección de polimorfismos en la transferrina	46
1.1.3 Electroforesis capilar	46
2.0 Análisis genéticos	47
2.1 Extracción de ADN genómico (ADNg).....	47
2.1 Búsqueda de alteraciones genéticas en pacientes con defectos de N-Glicosilación proteica.47	
2.1.1 Genotipado de <i>PMM2</i>	47
2.1.2 Genotipado de <i>ALG2</i>	48
2.2 Secuenciación masiva de genes o <i>Next Generation Sequence (NGS)</i>	49
2.2.1 Secuenciación completa del exoma (WES)	49
2.2.2 Secuenciación del exoma clínico	50
2.2.3 Filtrado y análisis de variantes génicas	51
3.0 Determinación de N-glicanos en suero por MALDI-TOF	52
3.1 Análisis y evaluación de datos MALDI-TOF MS	52
3.2 Análisis de N-glicanos de transferrina por MALDI-MS.....	53
4.0 Estudios glicómicos y hemostáticos en plaquetas de un paciente PMM2-CDG.....	54
4.1 Estudio de agregación plaquetaria en paciente un PMM2-CDG	54
4.2 Estudios hemostáticos.....	54
4.3 Análisis del perfil de glicanos en membrana plaquetaria por citometría de flujo	55
4.4 Análisis estadístico	56
RESULTADOS	57
Capítulo I	58
Hipótesis.....	59
Identificación de pacientes con alteraciones de N-glicosilación	59
1.0 Algoritmo bioquímico de estudio de pacientes con sospecha de CDG.	59
1.1 Cribado clínico de pacientes con sospecha de CDG	59
1.2 Screening bioquímico de transferrina sérica	61
1.2.3 Isoelectroenfoco de Transferrina	61
1.2.4 Electroforesis capilar de transferrina	62
2.0 Estudios genéticos en pacientes con alteraciones de N-glicosilación	63
2.1 Análisis Molecular del gen <i>PMM2</i> por Secuenciación Sanger	63
2.2 Estudio de variantes en genes causantes de CDG mediante secuenciación masiva	65
2.2.2 Determinación de variantes génicas en <i>ALG2</i> -CDG	65
2.2.3 Secuenciación Sanger y estudio de portadores para variante en <i>ALG2</i>	65
2.2.4 Identificación de variantes génicas en <i>PMM2</i>	67
2.2.5 Identificación de variantes génicas en <i>COG1</i>	69
2.2.6 Estudio genético de AR11 (CDG-IIx)	70
2.2.7 Identificación de variantes génicas en <i>ALG1</i> -CDG.....	71
3.0 Alteraciones secundarias de glicosilación	71
3.1 Polimorfismos proteicos en la transferrina	71

3.2 Otras alteraciones secundarias de glicosilación	73
4.0 Validación de la variante génica detectada en pacientes ALG2-CDG.....	76
4.0.1 Estudio poblacional de la VUS descrita para <i>ALG2</i>	77
CAPITULO II	81
Hipótesis	82
1.0 Estudios glicómicos en pacientes ALG2-CDG.....	82
1.1 Análisis MALDI-MS de transferrina sérica intacta	82
1.2 Análisis MALDI-MS de N-glicanos totales de transferrina	83
1.3 Análisis MALDI-MS de N-glicanos totales en suero	87
2.0 Caracterización glicómica de proteínas de membrana plaquetaria en PMM2-CDG	100
2.1 Evaluación hemostática del paciente AR02 PMM2-CDG.....	100
2.2 Caracterización del perfil glicómico en membrana plaquetaria de PMM2-CDG (AR02).....	101
Discusión	110
CONCLUSIONES	115
Bibliografía	118

Abreviaturas

AD: Autosómico dominante.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ADNg: ADN genómico

ADP: Adenosina di Fosfato

AG: Aparato de Golgi

AR: Autosómica recesiva

ATP: Adenosina tri fosfato

Asn: Asparragina

Arg: Arginina

CASAVA: *Consensus Assessment of Sequence Variation*

CDG: Desórdenes Congénitos de la Glicosilación (Congenital Disorders of Glycosylation)

CDG-I: Desórdenes de glicosilación tipo I

CDG-II: Desórdenes de glicosilación tipo II

CDG-x: Desórdenes Congénitos de la Glicosilación sin diagnóstico nosológico

CIES: Comité Interinstitucional de Ética de la Investigación de la Salud

CNX: Calnexina

COG: Complejo Oligomérico de Golgi

Con A: Concanavalina A

DMSO: Dimetil sulfoxido

Dol-PP: Dolicol pirofosfato

DNTPs: Deoxiribonucleótidos tri fosfato

EC: Electroforesis capilar

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EM: espectrometría de masas

EIM: Errores innatos del metabolismo

ERAD: Mecanismo de degradación asociada al RE

ERManI: α -manosidasa I

REESI-MS: Ionización por electrospray- Epectrometría de Masa

Fuc: Fucosa

G3M9: Glc₃Man₉GlcNAc₂

GI: Glucosidasa I

GII: Glucosidasa II

G1M9: Glc₁Man₉GlcNAc₂

G2M9: Glc₂Man₉GlcNAc₂

G3M9: Glc₃Man₉GlcNAc₂

Gal: Galactosa

GalNAc: N-acetilgalactosamina

Glc: Glucosa

GlcNAc: N-acetilglucosamina

GDP: Guanidina di Fosfato

GDP-Man: GDP-Manosa

GPI: Anclajes de glicosilfosfatidilinositol

HGVS: *Human Genome Variation Society*

hLys: Hidroxilisina

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

IEF: Isoelectroenfocado

IP3: Inositol tri-fosfato

M8: Man₈GlcNAc₂

M9: Man₉GlcNAc₂

Man: Manosa

Man-1-P: Manosa-1-Fosfato

Man-6-P: Manosa-6-Fosfato

MS: Espectrometría de masa

MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight*

O-Fuc: O-fucosil glicanos

O-Gal: O-galactosil glicanos

O-GalNAc: N-acetilgalactosaminil glicanos (O-glicanos tipo mucina)

O-Glc: O-glucosil glicanos

O-GlcNAc: O-N-acetilglucosaminil glicanos

O-Man: O-manosil glicanos

OMIN: *Online Mendelian Inheritance in Man*

O/N: *Over Night*

O-Xyl: O-xilosil glicanos

OST: Oligosacaridil Transferasa

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PNGasa F: Péptido-N-(4)-(N-acetil- β -D-glucosaminil) asparagina amidasa F

pI: Punto isoelectrico

PIGM-CDG: Deficiencia en el Glicosilfosfatidilinositol clase M

PMI-CDG: Deficiencia en Fosfomanosa-isomerasa

PMM2-CDG: Deficiencia en Fosfomanomutasa 2

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PPP: Plasma Pobre en Plaquetas

PRP: Plasma Rico en Plaquetas

RE: Retículo Endoplasmático

RMN: Resonancia magnética nuclear

S0: Asialotransferrina

S1: Monosialotransferrina

S2: Disialotransferrina

S3: Trisialotransferrina

S4: Tetrasialotransferrina

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

SDS-PAGE: Dodecil Sulfato de Sodio Geles en poliacrilamida

Seg: Segundos

Ser: Serina

SLC35-CDG: Deficiencia en el Transportador de Fucosa

SNV Variantes de un único nucleótido (Single Nucleotide Variant)

Tf: Transferrina

Thr: Treonina

TM: segmentos de transmembrana

UGGT: UDP-Glc-Glucosiltransferasa

WES: *Whole Exome Sequencing*

WGA: *Wheat Germ Agglutinin lectin*

VCF: formato de almacenamiento de variantes obtenidas por NGS (*Variant Calling File*)

XD: Dominante ligado a X.

XR: Recesivo ligado a X.

Xyl: Xilosa

*Algunos términos en inglés ampliamente utilizados en Biología Molecular y citometría de flujo y sin clara traducción en castellano se muestran en cursiva.

Índice de tablas

Tabla I: CDG asociados a N-Glicosilación I.....	5
Tabla II: CDG asociados a O-glicosilación II.....	9
Tabla III: CDG asociados a glicolípidos y anclas GPI.....	14
Tabla IV: CDG mixtos.....	18
Tabla V: Secuencia de los cebadores <i>forward</i> (F) y <i>reverse</i> (R) utilizados para la amplificación de los 8 exones del gen PMM2.....	48
Tabla VI: Secuencia de los cebadores <i>Forward</i> (F) <i>Reverse</i> (R) utilizados para la amplificación del exón 2 del geALG2.....	49
Tabla VII: Lectinas utilizadas y glicano que reconoce	56
Tabla VIII: Valores de isoformas de Transferrina sérica cuantificadas por EC en pacientes con IEF-Tf alterado.....	63
Tabla IX: Pacientes diagnosticados con CDG durante la realización de este trabajo de tesis período 2012–2019 en CEMECO	75
Tabla X: Datos glicómicos obtenidos del análisis de glicanos en suero y Tf por EM.....	91
Tabla XI: Determinaciones hemostáticas en PMM2-CDG (AR02	98
Tabla XII: Tabla XII: Perfiles Glicómicos observados en distintos tipos de CDG.....	110

Índice de figuras

Figura 1: Representación esquemática de la ruta biosintética de N-glicoproteínas.....	29
Figura 2: Screening bioquímico de CDG mediante el análisis de transferrina.	33
Figura 3: Etapas de preparación de la muestra para la secuenciación masiva.....	37
Figura 4: Esquema del procesamiento de datos.....	38
Figura 5: Características clínicas de los pacientes con PMM2-CDG.....	51
Figura 6: Características clínicas de los pacientes con PMM2-CDG.....	60
Figura 7: Algoritmo diagnóstico desarrollado para determinación de CDG.....	61
Figura 8: Separación de isoformas de transferrina por IEF-Tf.....	62
Figura 9: Electroferogramas de variantes encontradas en PMM2 en el paciente AR04.....	64
Figura 10: Análisis por secuenciación Sanger de variantes halladas en ALG2.....	66
Figura 11: Análisis de predicción de alteración del sitio donante de <i>splicing</i>	68
Figura 12: Estudio del gen PMM2 del paciente AR09.....	69
Figura 13: Estudio del gen COG1 paciente AR10.....	70
Figura 14: IEF-Tf de polimorfismo proteico de la Tf.....	72
Figura 15: Alteraciones secundarias de glicosilación.....	74
Figura 16: Espectros de masa MALDI de transferrina sérica intacta.....	83
Figura 17: Análisis MALDI-MS de N-glicanos permetilados de transferrina sérica en el paciente AR05	84
Figura 18: Análisis MALDI-MS de N-glicanos permetilados de transferrina sérica en el paciente AR06.....	85
Figura 19: Análisis MALDI-MS de N-glicanos permetilados de transferrina sérica En el paciente AR07.....	86
Figura 20: Espectro de masas MALDI de rango de masas bajo (m / z 1500-2430) de N-glicanos de suero permetilados.	88
Figura 21: Análisis de N-glicosilación en suero de pacientes con ALG2-CDG.....	89
Figura 22: Expresión de CD41 ⁺ en plaquetas de paciente PMM2-CDG vs Control Normal.....	99
Figura 23: Dot-plot expresión de AAL y CON-A.....	100
Figura 24: Dot-plot expresión de UEA-I y MAA-I.....	101
Figura 25: Dot-plot expresión de RCA y WGA.....	102
Figura 26: Grafico de barras que indica el binding de lectinas a los glicanos estudiados en membrana plaquetaria.....	103

Figura 27: Expresión de GSL-I y GSL-II en membrana plaquetaria.....	104
Figura 28: Expresión de PNA en membrana plaquetaria.....	105
Figura 29: Expresión de SNA en membrana plaquetaria.....	105
Figura 30: Análisis estadístico de unión (binding) de SNA en membrana plaquetaria.....	107

RESUMEN

Los Desórdenes Congénitos de Glicosilación (CDG) son enfermedades genéticas humanas causadas por defectos en la síntesis de N-, O-glicoproteínas o en la síntesis de glicolípidos. Existen distintos tipos de CDG que abarcan defectos en la biosíntesis de azucarares-nucleótidos, transportadores, glicosiltransferasas, transporte vesicular, como también en la biosíntesis de lípidos y anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Las manifestaciones clínicas son muy variadas, se presentan con fenotipos multisistémicos leves, o incluso graves, afectando la mayoría de los órganos y sistemas. Las formas más severas se asocian a alteraciones neurológicas que van desde el retraso psicomotor grave a moderada discapacidad intelectual. Los eventos trombohemorrágicos son muy frecuentes, siendo en gran medida causados por alteraciones de agregación plaquetaria. Este espectro fenotípico tan amplio, hace que el diagnóstico sea dificultoso en la mayoría de los casos.

En este trabajo de tesis se ha combinado el uso de diferentes tecnologías no implementadas hasta el momento en nuestro país para el diagnóstico de CDG. De esta manera se agilizó el protocolo diagnóstico con aumento de la tasa de éxito en la caracterización de pacientes. La utilización de secuenciación masiva de genes (NGS) en sus diferentes algoritmos (secuenciación del exoma completo, secuenciación de un panel de genes), en combinación con secuenciación *Sanger* y estudios bioquímicos convencionales (IEF-Tf) nos ha permitido identificar tres pacientes PMM2-CDG, un paciente COG1-CDG y tres pacientes ALG2-CDG, los primeros con una variante en homocigosis no reportada hasta el momento. También se pudo detectar alteraciones secundarias de la glicosilación de transferrina, no asociadas a CDG, llegando a diagnosticar un paciente con mutaciones en el gen *DYRK1A*. La combinación de NGS trae aparejada la identificación de nuevos genes o bien de variantes clínicas de significado incierto (VUS) en genes ya descritos para CDG, haciendo imperiosa la necesidad de caracterizar y validar estos nuevos cambios detectados. Las herramientas de análisis glicómico incorporadas nos permitieron caracterizar el perfil glicómico de pacientes ALG2-CDG, tanto en glicoproteínas totales de suero como asociado específicamente a Tf, estudios fundamentales para describir este tipo de CDG y defecto de glicosilación que ocasiona este gen mutado en la vía de formación de N-glicanos. La caracterización del perfil glicómico plaquetario en PMM2-CDG permitió

aportar conocimiento respecto a mecanismos fisiopatogénicos asociados a la hipoglicosilación en pacientes CDG.

Los resultados de esta tesis, en conjunto, destacan la utilidad de la NGS y la implementación de herramientas glicómicas, para ser aplicada al diagnóstico y caracterización de pacientes CDGs, el diagnóstico genético preciso necesario para proporcionar asesoramiento genético, prescribir tratamientos personalizados y proporcionar conocimientos para orientar la investigación hacia la búsqueda de nuevas terapias en el campo de la Medicina Personalizada o Medicina de Precisión.

SUMMARY

Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) are human genetic diseases caused by defects in the synthesis of N-, O-glycoprotein, or in the synthesis of glycolipids. Different types of CDG encompass defects in sugar-nucleotide biosynthesis, transporters, glycosyltransferases, vesicular transport, as well as in lipid biosynthesis and glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors. The clinical manifestations are very varied, they present with mild or even severe multisystemic phenotypes, affecting most organs and systems. The most severe forms are associated with neurological disorders ranging from severe psychomotor retardation to moderate intellectual disability. Thrombo-hemorrhagic events are very frequent, being largely caused by platelet aggregation abnormalities. This wide phenotypic spectrum makes diagnosis difficult in most cases.

This thesis work has combined the use of different technologies not implemented so far in our country for the diagnosis of CDG. In this way, the success rate in patient identification was speeded up and increased. The use of massive gene sequencing (NGS) in its different algorithms (complete exome sequencing, sequencing of a panel of genes), in combination with Sanger sequencing and conventional biochemical studies (IEF-Tf) has allowed us to identify three PMM2- CDG patients, one COG1- CDG patient, and three ALG2-CDG patients, the first with a homozygous variant not reported so far. It was also possible to detect secondary glycosylation alterations not associated with CDG, leading to the diagnosis of a patient with mutations in the DYRK1A gene. The combination of NGS entails the identification of new genes or clinical variants of uncertain significance (VUS) in genes already described for CDG, making the need to characterize and validate these new detected changes imperative. The built-in glycomics analysis tools allowed us to characterize the glycomics profile of ALG2-CDG patients, both in total serum glycoprotein's and specifically associated with Tf, fundamental studies to describe this type of CDG and the glycosylation defect caused by this mutated gene in the formation of N-glycans. The characterization of the platelet glycomics profile in PMM2-CDG allowed contributing knowledge regarding the physiopathogenic mechanisms associated with CDG.

The results of this thesis, as a whole, highlight the usefulness of the NGS, and the implementation of glycomics tools, to be applied to the diagnosis and characterization of CDG patients, the precise genetic diagnosis necessary to provide genetic

counseling, prescribe personalized treatments, and provide knowledge to orient research towards the search for new therapies in the field of Personalized Medicine or Precision Medicine.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

Entre las distintas posibilidades que existían a la hora de estructurar la presente Memoria de Tesis, hemos decidido organizar los contenidos de la misma, de la siguiente forma:

La Tesis se inicia con una **Introducción** general, que recoge los antecedentes más representativos del tema de trabajo y permite determinar el contexto en el que se encuadra el trabajo realizado. Posteriormente se exponen los **Objetivos generales y específicos**, que fueron determinados al comienzo de la realización de este trabajo.

Se incluye un apartado de **Materiales y Métodos** donde se describen de forma detallada las técnicas utilizadas durante el desarrollo de este estudio, así como los materiales necesarios para las mismas.

Adicionalmente, al principio de cada capítulo se incluyen las **Hipótesis** que dieron origen a este trabajo de tesis doctoral y posteriormente se exponen los **Resultados** obtenidos. En el apartado **Discusión** se presenta un resumen y análisis de los resultados más significativos.

El **Capítulo I** está referido a “Desórdenes Congénitos de Glicosilación: detección bioquímica e investigación de variantes génicas”. Resultados de este capítulo de tesis han sido incluidos en la siguiente publicación:

Ten Years of Screening for Congenital Disorders of Glycosylation in Argentina: Case Studies and Pitfalls Original Article. Asteggiano, **CG**; **Papazoglu M.**; Bistué Millón MA; Azar N; Specola N.; Guelbert N.; Suldrup N.; Pereyra M.; Peralta M.F.; Dodelson de Kremer, R. 2018, Pediatric Research, a Nature Research Journal.

Manuscrito en preparación:

“A novel *COG1* variant causing a congenital disorder of glycosylation of neonatal onset”. Comunicación corta. Marne Salazar, Sebastián Silva, Benjamín Solar, **Gabriela M Papazoglu**, Carla G Asteggiano, Noriko Miyake, Naomichi Matsumoto. Journal of Human Genetics.

El **Capítulo II** dirigido a: “Caracterización glicómica de pacientes CDG”.

Resultados de este capítulo han sido incluidos en la siguiente publicación:

"Mass spectrometry glycophenotype characterization of ALG2-CDG argentinean patients with a new genetic variant in homozygosis. Artículo Original. **Gabriela Magali Papazoglu**, Marisa Cubilla, Marcela Pereyra, Raquel Dodelson de Kremer, Belén Pérez, Luisa Sturiale, Carla G Asteggiano. Glycoconjugate Journal. Submitted Mayo 2020; last revision Octubre 2020.

Manuscrito en preparación:

"Membrane platelet glycoprofiling in a PMM2-CDG patient". Artículo original.

Papazoglu G.M.; Silvera Ruiz S.M; Salinas R.; Pereyra M.I.; Cubilla M.; Pessaola, Favio; Ghione, Silvia; Nabila, Ramadán; Martinez–Duncker I.; Asteggiano C.G. Journal of Inborn Errors of Metabolismo and Screening (JIEMS).

Al final de la Tesis, en el apartado de **Conclusiones**, a manera de cierre se presentan en orden secuencial, un resumen de los resultados obtenidos y discutidos previamente en cada capítulo.

Por último, al final de la Memoria de la Tesis se incluye la **Bibliografía** citada.

INTRODUCCIÓN

1.0 Errores Innatos del Metabolismo (EIM)

Los Errores Innatos del Metabolismo (EIM) son un grupo heterogéneo de patologías de origen genético que ocurren como resultado de cambios o mutaciones heredadas o espontáneas en genes que codifican para proteínas que intervienen en diferentes rutas metabólicas. En su conjunto se los clasifica dentro del amplio mundo de las Enfermedades Poco Frecuentes, como aquellas que implican la alteración de las vías metabólicas celulares involucradas en la síntesis, degradación o el almacenamiento de carbohidratos, ácidos grasos y proteínas, entre otras (Morava et al., 2015).

Este trabajo de tesis se enfoca específicamente en el estudio de EIM debidos a alteraciones en genes implicados en la vía de formación de glicoconjugados en seres humanos.

1.1 Glicosilación celular y Desórdenes Congénitos de la Glicosilación en seres humanos

El proceso de glicosilación en seres humanos comprende una ruta metabólica conservada y precisa que incluye diferentes etapas secuenciales localizadas principalmente en citosol, retículo endoplásmico (RE) y Aparato de Golgi (AG), cuya acción sinérgica da lugar a la formación de glicoconjugados entre los que podemos citar glicoproteínas, glicolípidos, glicosaminoglicanos y demás compuestos que poseen una porción glicosídica (Aebi, 2013). La glicosilación es una de las modificaciones post-traduccionales más compleja, ubicua y esencial para que se lleven a cabo funciones biológicas críticas a nivel celular, tisular y orgánico (Pascoal et al., 2020). A nivel proteico, aproximadamente la mitad de las proteínas que se expresan en una célula se someten a glicosilación para lograr su funcionalidad completa. Los glicanos garantizan la estabilidad y maduración de las proteínas, intervienen como inmunomoduladores (inmugenicidad), confiriendo muchas veces nuevas funciones a las proteínas (Aebi, 2013; Pascoal et al., 2020).

En seres humanos podemos diferenciar dos clases de glicanos según el enlace glicosídico unido a la proteína: N-glicanos y O-glicanos. Los N-glicanos están unidos al grupo amida de la asparagina (Asn) y su síntesis se desarrolla en tres etapas secuenciales: formación de dadores de azúcares nucleótidos, ensamblaje (citosol y ER) y procesamiento (Aparato de Golgi). Los O-glicanos están unidos al grupo hidroxilo de residuos de serina (Ser) o treonina

(Thr) de la proteína y su formación no implica un procesamiento, y ocurre principalmente en el Aparato de Golgi (Péanne et al., 2017). Los glicanos que se encuentran en forma libre o no conjugada, frecuentemente definen propiedades estructurales y funcionales en los espacios fisiológicos donde se encuentran, como es el caso de los glicosaminoglicanos de la matriz extracelular (ej. dermatán sulfato) (Prestegardet, J.H; Jian L, Göran W., 2017).

Los Desórdenes de la Glicosilación engloban defectos asociados tanto a hipoglicosilación como a hiperglicosilación. Dentro de las alteraciones de hipoglicosilación se encuentran los defectos genéticos de la glicosilación que pueden clasificarse en dos grupos: Desórdenes Congénitos Primarios de la Glicosilación (CDG) y en enfermedades genéticas que causan hipoglicosilación secundaria (galactosemia, fructosemia, entre otras) (Jaeken & Péanne, 2017). Además existen alteraciones de la glicosilación por causas no genéticas que producen hipoglicosilación como es el caso de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN) (una enfermedad clonal y adquirida causada por una mutación somática en el gen *PIG-A* que se encuentra en el cromosoma X y codifica una proteína involucrada en la síntesis del glicosilfosfatidilinositol GPI), o "externa" (abuso de alcohol, infecciones con microorganismos que producen neuraminidasa, entre otras) (Jaeken & Morava, 2016). Se han descrito otras alteraciones de glicosilación debido a causas genéticas que producen hiperglicosilación: ya sea por mutaciones que introducen un nuevo sitio de glicosilación asparragina (Asn), treonina (Thr), serina (Ser) causando la introducción de un nuevo glicano dando como resultado una proteína alterada que puede ser causante de enfermedad (Vogt et al., 2007) y los desórdenes genéticos en la degradación o deglicosilación de proteínas, como por ejemplo defectos lisosomales producidos por la degradación de glicosfingolípidos, glicosaminoglicanos y deficiencia de N-glicanasa-1 (Jaeken & Péanne, 2017).

Los desórdenes congénitos de la Glicosilación (CDG) son un grupo diverso de alteraciones de origen genético que comprende más de 133 genes asociados a enfermedades causadas por defectos en la síntesis de glicanos o en su unión a proteínas y lípidos. Recientemente fueron incluidos a este grupo, los defectos en la síntesis de anclajes de glicosilfosfatidilinositol (anclajes GPI) (Francisco et al., 2019).

Este grupo de enfermedades metabólicas tiene una presentación multisistémica, asociado a un espectro clínico principalmente con síndrome convulsivo de origen desconocido, hipoplasia cerebelosa y retardo psicomotor, pudiendo observarse lipodistrofia, mamilas invertidas e hipotonía axial, entre otras manifestaciones. Hay determinados tipos de

CDG que presentan síntomas patognomónicos siendo los más reconocidos a nivel mundial mamilas invertidas, acumulación diferencial de tejido graso e hipoplasia cerebelosa asociado a retraso psicomotor en la deficiencia denominada PMM2-CDG) cuyo hallazgo facilita el diagnóstico presuntivo (Morava et al., 2015; Francisco et al., 2019).

La mayoría de las clases de CDG conocidas son defectos de N-glicosilación. Sin embargo, en la última década han sido descritas clases de CDG debidas a alteraciones de O-glicosilación conocidas previamente de manera genérica como síndromes de etiología desconocida, entre ellas podemos mencionar diferentes clases de distrofias musculares, condrodisplasias, mucopolisidosis I y II, trastornos de la migración neuronal, entre otras.

Avances en la metodología de detección masiva de alteraciones genéticas, han permitido en los últimos años la identificación de nuevas clases de CDG, haciendo necesario la organización de la nomenclatura y pasando actualmente a denominarse cada clase de CDG utilizando el nombre del gen mutado, seguido de la palabra “CDG”, por ejemplo, para referirnos a la deficiencia de la enzima glicosiltransferasa Fosfomanomutasa 2, codificada por el gen *PMM2*, la nombramos como “PMM2-CDG”. Esta nomenclatura fue propuesta por el Prof. Jaak Jaeken (Jaeken, 2010), pionero en el descubrimiento de estas patologías, siendo posteriormente establecida esta clasificación que se sigue utilizando actualmente (Jaeken & Péanne, 2017).

A manera de resumen se incluyen a continuación las tablas respectivas donde se describen las diferentes clases de CDG descritas hasta el momento:

- Defectos en la N-glicosilación de proteínas (Tabla I).
- Defectos en la O-glicosilación de proteínas (Tabla II)
- Defectos en la glicosilación de glicosfingolípido y anclajes de glicosilfosfatidilinositol (Tabla III)
- Defectos mixtos en múltiples rutas de glicosilación (Tabla IV).

Tabla I: CDG asociados a N-Glicosilación I (Jaeken & Péanne, 2017; Péanne et al., 2017).

CDG asociados a N-Glicosilación				
CDG	Hallazgos clínicos	Proteínas afectada	OMIM	Herencia
Con afectaciones en SNC				
ALG1	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, hipotonía, inmunodeficiencia, infecciones, falla hepática, hipogonadismo, miocardiopatía hipertrófica, nefropatía, microcefalia, micrognatia, hipertelorismo, fontanela alargada.	GDP-Man: GlcNAc2-PP-Dol manosiltransferasa I	608540	AR
ALG2	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, hipotonía, hipomielinización, nistagmo, coloboma del iris, hepatomegalia, coagulopatía, infecciones, microcefalia, cataratas.	GDP-Man: Man1GlcNAc2-PP-Dol manosiltransferasa II	607906	AR
ALG3	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, hipotonía, atrofia cerebral atrofia cerebelar progresiva, atrofia del nervio óptico, microcefalia postnatal, hipertelorismo con puente nasal ancho, orejas gruesas y alargadas, labios delgados, micrognatia.	Dol-P-Man: Man5GlcNAc2-PP-Dol manosiltransferasa VI	601110	AR
ALG6	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, ataxia, convulsiones, hipotonía, falla hepática, problemas de alimentación, microcefalia.	Dol-P-Glc: Man9GlcNAc2-PP-Dol glucosiltransferasa I	603147	AR
ALG8	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, hipotonía, ascitis, coagulopatía, enteropatía perdedora de proteínas, hepatomegalia, nefropatía, linfedema, cataratas, orejas de implantación baja, retrognatia.	UDP-GlcNAc- GlcNAc-PP-Dol glucosiltransferasa II	608104	AR
ALG9	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, hipotonía muscular, hepatomegalia, microcefalia progresiva, hipertelorismo, puente nasal deprimido, frente protuberante, orejas con implantación baja, boca grande.	Dol-P-Man: Man 6 y 8 GlcNAc2-PP-Dol manosiltransferasa VII/IX	608776	AR

ALG11	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, falta de desarrollo del habla convulsiones, opistódomo, hipotonía, deterioro auditivo neurosensorial, desorden en la termorregulación, dificultades en la ingesta de alimentos y vómitos, pezones invertidos, microcefalia, estrabismo, frente alta, línea de cabello posterior baja.	Dol-P-Man: Man 4 y 5 GlcNAc2-PP-Dol manosiltransferasa IV/V	613661	AR
ALG12	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, hipotonía, convulsiones, hipogonadismo, hipogamaglobulinemia, infecciones respiratorias, recurrentes, coagulopatía, microcefalia progresiva.	Dol-P-Man: Man7GlcNAc2-PP-Dol manosiltransferasa VIII	607143	AR
ALG13	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, desarrollo tardío del habla y lenguaje, deterioro cognitivo, autismo, convulsiones, hipotonía, anormalidad del ventrículo lateral, atrofia del nervio óptico, nistagmo horizontal, hirsutismo, pobre control de la cabeza, contacto visual deficiente, disminución del peso corporal, hepatomegalia, infecciones recurrentes, microcefalia, pulgar aducido, punta nasal hacia arriba, barbilla corta, filtrum largo, hipertelorismo.	UDP-GlcNAc:Dol-P-GlcNAc-P transferasa	300884	X D
ALG14	Retraso psicomotor, hipotonía, síndrome miasténico, parálisis facial, calambres musculares, escoliosis, múltiples contracturas articulares, hiperlaxitud articular, ptosis, estrabismo.	UDP-GlcNAc: Dol-PP-GlcNAc transferasa	616227	AR
DDOST	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, hipotonía, convulsiones, disfunción motora-oral, hipomielinización, coagulopatía, esteatosis hepática, hipotiroidismo primario, falta de crecimiento, maduración esquelética acelerada, infecciones del oído, lipodistrofia, movimiento muscular no intencional, osteopenia, piel seca, proteinuria nefrótica, reflujo gastroesofágico, baja estatura, esotropía, baja estatura.	Subunidad DDOST del complejo OST	614507	AR
DPAGT1	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, hipotonía, convulsiones, infecciones, síndrome miasténico congénito, microcefalia, micrognatia, clinodactilia del quinto dedo.	UDP-GlcNAc:Dol-P-GlcNAc-1-P transferasa	608093	AR

MAN1B1	Discapacidad intelectual no sindrónica (NSID), retraso psicomotor, retraso del habla, características dismórficas variables, obesidad troncal, macrocefalia.	Manosidasa I	614202	AR
MGAT2	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, problemas de alimentación, coagulopatía, diarrea severa, orejas largas con rotación posterior con anti hélix prominente, boca abierta, dientes grandes y compactados, estatura alta.	GlcNAc transferasa II	212066	AR
MOGS	Convulsiones, hipotonía, dificultad en la ingesta de alimentos, hepatomegalia, coagulopatía, hipoplasia genital, escoliosis, movimientos estereotípicos de las manos, occipucio prominente, fisuras palpebrales cortas, cejas largas, nariz ancha, paladar con arco alto, retrognatía. Tetrasacárido único en la orina, hipogamaglobulinemia severa.	Glucosidasa I	606056	AR
PMM2	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, retraso en el crecimiento, convulsiones, hipotonía, hipoplasia cerebelosa, hiporeflexia, diarrea, coagulopatía, cardiomiopatía, endocrinopatía, hepatopatía, estrabismo, dedos largos, lipodistrofia, boca ancha, pezones invertidos, filtrum largo, laxitud articular.	Fosfomanomutasa II	212065	AR
RFT1	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, discapacidad auditiva, discapacidad visual sin fijación, anomalía de la fosa craneal posterior, lesión de los ganglios basales, ataxia, hipotonía, atrofia cortical cerebral, convulsiones, estatura baja, artrogriposis múltiple congénita, dificultad en la ingesta de alimentos, hepatomegalia, coagulopatía, microcefalia, micrognatía, pulgares aducidos, pezones invertidos.	Man5GlcNAc2-PP-Dol-flipasa	612015	AR
SSR3	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, estructura cerebral anormal, microcefalia.	Proteína de la secuencia señal del receptor del complejo TRAP, gamma	606213	AR

SSR4	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, hipotonía, coagulopatía, conducto arterioso persistente, dificultad en la ingesta de alimentos, reflujo gastroesofágico, vómito, dislocación articular, escoliosis, riñón en herradura, microcefalia, estrabismo, boca ancha, macrotia, dientes espaciados, micrognatia, exceso de piel alrededor del cuello.	Proteína de la secuencia señal del receptor del complejo TRAP, delta	300934	X R
STT3A	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, atrofia cerebelosa, convulsiones, hipotonía, criptorquidia, dificultad en la ingesta de alimentos, microcefalia, micropene, hipoplasia escrotal.	Subunidad del complejo OST	615596	AR
STT3B	Discapacidad intelectual, retraso en el crecimiento intrauterino, retraso psicomotor, atrofia cerebelosa, hipotonía, atrofia óptica, convulsiones, criptorquidia, dificultad en la ingesta de alimentos, dificultad respiratoria, trombocitopenia, microcefalia, micropene.	Subunidad del complejo OST	615597	AR
TUSC3	Discapacidad intelectual no sindrómica (NSID).	Subunidad del complejo OST	611093	AR
Sin afectaciones en SNC				
FUT8	Retraso psicomotor severo, dificultades respiratorias, problemas de alimentación, baja estatura.	α 1-6 fucosiltransferasa	618005	AR
GANAB	Enfermedad renal y poliquística autosómica dominante.	Subunidad α de la glucosidasa II	600666	AR
MPI	Coagulopatía, enteropatía perdedora de proteínas, fibrosis hepática, hipoglucemia, hiperinsulinemia, linfedema, vómitos.	Fosfomano isomerasa	602579	AR
PRKCSH	Enfermedad renal y poliquística autosómica dominante.	Subunidad β de la glucosidasa II	174050	AR

AR: Autosómica recesiva. XD: Dominante ligado a X. XR: Recesivo ligado a X.

Tabla II:CDG asociados a O-glicosilación I (Jaeken & Péanne, 2017).

CDG asociados a O-Glicosilación				
CDG	Hallazgos clínicos	Proteínas afectada	OMIM	Herencia
Con afectaciones en SNC				
B3GALTL	Discapacidad intelectual, retraso en el crecimiento prenatal y postnatal, anomalía de Peters, anomalía de la cámara anterior ocular, hidrocefalia, braquidactilia, micrognatia, labio y paladar hendidos.	β 1-3 Glc transferasa	261540	AR
CHSY1	Discapacidad intelectual, discapacidad auditiva, baja estatura, anomalías de pies y manos.	Condroitina sintasa I GalNAc/GlcAc	605282	AR
EXTL3	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, inmunodeficiencia combinada grave, displasia esquelética.	GlcA/GlcNAc-transferasa	617425	AR
PLOD	Retraso psicomotor, ceguera, desprendimiento de retina, glaucoma, hemorragias gastrointestinales, hernia inguinal, hipotonía, insuficiencia respiratoria, miopía, osteoporosis, ruptura arterial, escoliosis congénita progresiva, hiperlaxitud articular, microcórnea, pie plano, piel hiperextensible.	Lisil-hidroxilasa 1	225400	AR
XYLT1	Discapacidad intelectual moderada, retraso psicomotor, distribución alterada de la grasa, pseudoxantoma elástico, cara plana con ojos prominentes, sinofris, bordes nasales profundos, macrocefalia relativa, filtrum largo, pulgares anchos,	Xilosiltransferasa I	615777	AR

	clinodactilia, coxa valga, pies planos, piel con apariencia abultada, displasia esquelética, baja estatura, laxitud articular.			
XYLT2	Defectos leves de aprendizaje, pérdida auditiva neurosensorial, desprendimiento de retina, osteoporosis, cataratas, anormalidades de la columna.	Xilosiltransferasa II	605822	AR
Con afectación del SNC y distrofia muscular				
B3GALNT2		β 1-3 GalNAc-transferasa 2	615181	AR
B4GAT1	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, hipotonía. CK elevada, malformaciones cerebrales (hidrocefalia, lisencefalia, paquigiria, polimicrogria, hipoplasia cerebelar, atrofia cortical, quistes cerebelosos) y oculares (desprendimiento de retina, displasia de retina, cataratas, atrofia del nervio óptico), espasticidad.	β 1-4 glucuroniltransferasa	615287	AR
FKRP	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, hipotonía. CK elevada, malformaciones cerebrales (hidrocefalia, lisencefalia, paquigiria, polimicrogria, hipoplasia cerebelar, atrofia cortical, quistes cerebelosos) y oculares (desprendimiento de retina, displasia de retina, cataratas, atrofia del nervio óptico), espasticidad.	Proteína relacionada a fukutina, ribitol 5 fosfato transferasa	613153	AR

FKTN	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, hipotonía. CK elevada, malformaciones cerebrales (hidrocefalia, lisencefalia, paquigiria, polimicrogria, hipoplasia cerebelar, atrofia cortical, quistes cerebelosos) y oculares (desprendimiento de retina, displasia de retina, cataratas, atrofia del nervio óptico), espasticidad.	Ribitol 5 fosfato transferasa	253800	AR
ISPD		Metileritritol 4-fosfato citidiltransferasa	614643	AR
LARGE		Homólogo de la β1, 3-N-acetil-glucoaminiltransferasa	613154	AR
POMGNT1		O-Man: GlcNAc transferasa I	253280	AR
POMGNT2		β1-4 GlcNAc-transferasa	614830	AR
POMK		O-Man cinasa	615249	AR
POMT1		O-Manosil transferasa I	613155	AR
POMT2		O-Manosil transferasa II	613150	AR
TMEM5		β1-4 xilosiltransferasa	615041	AR
Sin afectaciones en SNC				
B3GALT6	Hipotonía, deformidad de la columna vertebral, dislocación articular, laxitud de la piel, tejidos esqueléticos y conectivos anormales.	β1-3 Gal-transferasa II	271640	AR
B3GAT3	Defectos congénitos del corazón, esclerótica azul, baja estatura, dislocaciones de hombro, cadera, codo y rodilla, dismorfismo cráneo-facial, frente prominente, puente nasal deprimido, proptosis.	β1-3 GlcA-transferasa I	245600	AR

B4GALT7	Forma progeroide con retraso psicomotor, cicatrización de heridas defectuosas, hipotonía, osteopenia, piel suelta pero elástica, hiperlaxitud articular, baja estatura, cara relativamente pequeña con frente prominente, puente nasal aplanado, ojos grandes y protuberantes, orejas pequeñas, pliegues nasolabiales profundos, boca pequeña y cuello corto.	Galactosiltransferasa VII	130070	AR
C1GALT1C1	Anemia hemolítica con trombocitopenia, leucopenia.	Chaperona de β 1-3 Galactosiltransferasa	300622	X L
CANT1	Retraso en el crecimiento prenatal y postnatal grave, escoliosis progresiva, extremidades cortas, laxitud articular.	UDP-Gal nucleotidasa	251450	AR
CHST14	Hiperlaxitud articular, pie equinovaro, pulgar aducido, laxitud de la piel, cifoscoliosis severa, hipotonía, braquicefalia, fontanela grande, hipertelorismo, fisuras palpebrales en declive, microcórneas, pliegues nasolabiales prominentes, estrabismo, labio superior delgado, boca pequeña, paladar alto, microretrognatia.	Dermatán sulfato GalNAc 4-O sulfotransferasa 1	601776	AR
CHST3	Pie equinovaro, dislocación de rodillas y/o cadera, displasia de la articulación del codo con subluxación y extensión limitada, baja estatura, cifosis.	Condroitín-6-O-sulfotransferasa	143095	AR
CSGALNACT1	Baja estatura y laxitud articular.	Condroitín sulfato N-acetilgalactosaminiltransferasa-1	616615	AR

DSE	Hematomas subcutáneos grandes, esclerótica azul. Contracturas congénitas de los pulgares y pies, debilidad muscular, hiperlaxitud de las articulaciones de los dedos, frente prominente, fontanela anterior abierta, telecanto, paladar alto, apiñamiento dental, braquicefalia, orejas prominentes.	Dermatán sulfato epimerasa	615539	AR
EOGT	Aplasia cutis congénita, uñas hipoplásicas o ausentes, falanges distales variablemente ausentes, defecto septal atrial y ventricular.	Dominio EGF de la O-GlcNAc transferasa	615297	AR
EXT1	Exostosis múltiple del hueso, caracterizado por múltiples proyecciones de hueso cubiertas por cartílago, deformidad en manos, antebrazos y piernas.	Exostosina 1	133700	AD
EXT2		Exostosina 2	133701	AD
GALNT3	Depósitos masivos de fosfato de calcio en la piel y tejidos, pseudoxantoma elástico.	O-GalNac transferasa	211900	AR
LFNG	Disostosis espondilocostal con anomalías vertebrales graves, dedos largos y delgados, camptodactilia del dedo índice izquierdo, cifosis.	GlcNAc transferasa	609813	AR
POFUT1	Trastorno de la piel que muestra hiper e hipopigmentación reticulada en regiones de flexión como el cuello, la axila y las áreas debajo de los senos y la ingle.	O-fucosil transferasa	615327	AD
POGLUT1	Prurito, trastorno de la piel que muestra hiper e hipopigmentación reticulada en regiones de flexión como el cuello, la axila, las puntas de las orejas y las áreas debajo de los senos y la ingle.	Proteína O-glicosiltransferasa 1	615696	AD

Tabla III: CDG asociados a glicolípidos y anclas GPI (Jaeken & Péanne, 2017).

CDG asociados a Glicolípidos y anclas GPI				
CDG	Hallazgos clínicos	Proteínas afectadas	OMIM	Herencia
Con afectaciones en SNC				
B4GALNT1	Discapacidad intelectual, disartria, discinesia, neuropatía periférica, atrofia cortical, cataratas, debilidad muscular, espasticidad de las extremidades, escoliosis.	β 1-4 GalNAc-transferasa 1 (GM2)	609195	AR
GPAA1	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, atrofia cerebelosa, convulsiones, hipotonía, osteopenia/osteoporosis, estrechamiento bitemporal, hipertelorismo, raíz nasal amplia y narinas antevertidas.	Complejo GPI transamidasa	617810	AR
PGAP1	Discapacidad intelectual, deterioro visual cortical, hipotonía, retraso psicomotor, anomalías estructurales cerebrales, orejas grandes, raíz nasal aplanada, cabeza pequeña, frente prominente, cejas arqueadas, boca grande con dientes anormales, cuello corto, morfología anormal de las manos, estrabismo, nistagmo.	Inositol deacilasa	615802	AR
PGAP2	Discapacidad intelectual, discapacidad motora con afectación de la deambulación, habla deficiente, hipotonía. Aumento de la fosfatasa alcalina sérica, microcefalia, paladar hendido, puente nasal amplio.	Fosfolipasa A2	614207	AR
PGAP3	Discapacidad intelectual, falta de adquisición del habla, convulsiones, hipotonía, retraso psicomotor. Aumento de la fosfatasa alcalina sérica, hipertelorismo, fisuras	Proteína remodeladora del ancla GPI	615716	AR

	palpebrales ascendentes, puente nasal ancho, nariz corta, filtrum largo, lóbulos grandes y carnosos.			
PIGA	Anomalías congénitas variables que afectan los sistemas nervioso central, cardíaco y urinario, cirrosis, convulsiones mioclónicas, hipotonía neonatal, secuencia de Pierre Robin, occipucio prominente, fontanela amplia, puente nasal deprimido, narinas antevertidas, aplanamiento malar, hélix sobreplegada, hipertrofia gingival, boca pequeña de forma triangular, cuello pequeño, pecho globuloso y uñas pequeñas.	GlcNAc transferasa (GPI-GnT)	300868	X R
PIGC	Discapacidad intelectual y retraso psicomotor, epilepsia.	GlcNAc transferasa (GPI-GnT)	617816	AR
PIGG	Discapacidad intelectual, convulsiones, hipotonía, ataxia, retraso psicomotor, cuerpo calloso delgado, asimetría de los ventrículos laterales, hipoplasia cerebelosa y atrofia cerebral leve.	GlcNAc transferasa (GPI-GnT)	616917	AR
PIGH	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, autismo, convulsiones, hipertrigliceridemia, hipotonía, cuerpo calloso displásico.	Proteína H de la biosíntesis del ancla GPI	618010	AR
PIGL	Discapacidad intelectual, colobomas, convulsiones, defectos cardíacos congénitos, dermatosis ictiosiforme, anomalías en las orejas, paladar hendido, braquidactilia.	GlcNAc transferasa (GPI-GnT)	280000	AR
PIGM	Discapacidad intelectual, convulsiones, trombosis, hipertensión.	GlcNAc transferasa (GPI-GnT)	610293	AR
PIGN	Discapacidad intelectual, convulsiones, hipotonía, anomalías congénitas variables que afectan los	GlcNAc transferasa (GPI-GnT)	614080	AR

	sistemas cardíaco, urinario y gastrointestinal, retraso psicomotor, circunferencia de la cabeza grande al nacer, boca abierta, labios delgados, puente nasal deprimido, estrechamiento bitemporal, orejas grandes con hélices sobre plegadas y facies gruesas, nistagmo.			
PIGO	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, convulsiones, hipotonía. Aumento de la fosfatasa alcalina sérica, braquicefalia, microcefalia, estenosis anal, puente nasal corto, fisuras palpebrales largas, hipoplasia de las uñas y/o uñas ausentes.	GlcNAc transferasa (GPI-GnT)	614749	AR
PIGP	Discapacidad intelectual, convulsiones, hipotonía, retraso psicomotor, circunferencia pequeña de la cabeza, cuerpo caloso delgado.	Proteína de síntesis de GlcNAc-PI	617599	AR
PIGQ	Encefalopatía epiléptica.	GlcNAc transferasa (GPI-GnT)	605754	AR
PIGT	Discapacidad intelectual, convulsiones, hipotonía neonatal, anomalías congénitas variables que afectan los sistemas cardíaco, urinario y gastrointestinal, macrocefalia, braquicefalia, frente alta con estrechamiento bitemporal, puente nasal deprimido, filtrum largo con un surco profundo, boca abierta, hipoplasia cerebelosa, estrabismo, nistagmo.	GlcNAc transferasa (GPI-GnT)	615398	AR
PIGV	Discapacidad intelectual, convulsiones, epilepsia, hipotonía. Aumento de los niveles de fosfatasa alcalina sérica, braquicefalia, macrocefalia, falanges hipoplásicas,	GlcNAc transferasa (GPI-GnT)	239300	AR

	cejas arqueadas, paladar hendido, puente nasal ancho, hipertelorismo, displasia en las uñas.			
PIGW	Discapacidad intelectual, convulsiones, hipotonía, retraso psicomotor. Aumento de la fosfatasa alcalina sérica, puente nasal ancho.	GlcNAc transferasa (GPI-GnT)	616025	AR
PIGY	Discapacidad intelectual, convulsiones, hipotonía. Aumento de los niveles de fosfatasa alcalina sérica, fisuras palpebrales largas, cataratas congénitas, estrabismo, puente nasal deprimido, cuello corto, lóbulos de las orejas carnosos, braquicardia, displasia de cadera, osteopenia.	GlcNAc transferasa (GPI-GnT)	616809	AR
ST3GAL5	Discapacidad intelectual, regresión del desarrollo, convulsiones, pérdida visual, máculas cutáneas hipo o hiperpigmentadas en la cara, el tronco y/o las extremidades, hipoplasia y prognatismo de cara media, microcefalia, escoliosis.	Lactosilceramida α -2,3 sialiltransferasa (GM3)	609056	AR
Sin afectaciones en SNC				
A4GALT	Problemas en el grupo sanguíneo tipo P.	Lactosilceramida α 1-4 Gal transferasa	111400	AD

AR: Autosómica recesiva. XR: Recesivo ligado a X.

Tabla IV: CDG mixtos (Jaeken & Péanne, 2017).

CDG mixtos				
CDG	Hallazgos clínicos	Proteína afectada	OMIM	Herencia
Con afectaciones en SNC				
ARCN1	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, autismo, convulsiones, defecto del tabique ventricular, criptorquidia, catarata posterior, microcefalia, micrognatia, paladar hendido, laxitud de las articulaciones pequeñas.	COP-I subunidad delta	617164	AD
ATP6AP1	Discapacidad intelectual, anomalías neurocognitivas variables, disfunción hepática, inmunodeficiencia, hipogammaglobulinemia.	Subunidad S1 de la V-ATPasa	300972	X R
ATP6AP2	Discapacidad intelectual, hiporreflexia, parkinsonismo, cutis laxa, atrofia cerebelar.	Subunidad de la V-ATPasa	300556	X R
ATP6V0A2	Discapacidad intelectual, hipotonía, epilepsia, convulsiones, dificultad en la ingesta de alimentos, miopatía, osteoporosis, anomalías craneofaciales, cierre tardío de las fontanelas, microcefalia, cutis laxa, hiperlaxitud articular, dislocación congénita de la cadera, escoliosis, hernias abdominales, filum largo.	Subunidad A2, dominio V0 de la V-ATPasa	219200	AR
B4GALT1	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, malformación de Dandy-Walker, hipotonía, miopatía, coagulopatía, hepatomegalia, anomalías craneofaciales, hidrocefalia, hipertensión intracraneal, macrocefalia.	β 1-4 galactosiltransferasa	607091	AR
CAD	Discapacidad intelectual, regresión severa del desarrollo, retraso psicomotor, convulsiones de inicio	Carbamil fosfato sintetasa II/Aspartato transcarbamilasa	616457	AR

	temprano, anemia normocítica, hipotonía.			
CCDC115	Discapacidad intelectual, hepatoesplenomegalia aminotransferasas elevadas, colesterol elevado, fosfatasa alcalina derivada de hueso muy elevada, metabolismo anormal del cobre, cara larga y ptosis.	Proteína con dominio de superenrollamiento 115	616828	AR
COG1	Discapacidad intelectual, hipotonía, anormalidades cardiovasculares, baja estatura, dificultad en la ingesta de alimentos, espondilosis, hepatomegalia, osteoporosis, anormalidades craneofaciales, micrognatia, hipertelorismo, puente nasal ancho, filtrum largo, boca pequeña, paladar alto, orejas poco rotadas, microtia derecha, huesos acortados.	Complejo COG, subunidad 1	611209	AR
COG2	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, cuadriplejia espástica, convulsiones, disfunción hepática, hipoceruloplasminemia, hipocupremia, microcefalia.	Complejo COG, subunidad 2	617395	AR
COG4	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, epilepsia, ataxia, hipotonía, convulsiones, falta de crecimiento en la infancia con diarrea recurrente, dificultad en la ingesta de alimentos, hepatoesplenomegalia, infecciones del tracto respiratorio, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, muerte prematura, anormalidades cráneo-faciales, microcefalia, nistagmo, hiperreflexia.	Complejo COG, subunidad 4	613489	AR
COG5	Discapacidad intelectual, ataxia, discinesia, hipotonía, retraso del habla, atrofia del cerebelo y del tronco cerebral.	Complejo COG, subunidad 5	613612	AR

COG6	Discapacidad intelectual, convulsiones, epilepsia, hipotonía, hepatomegalia, diarrea, vómitos, enfermedades renales, hiperhidrosis e hiperqueratosis, retrognatia, microcefalia, fisuras palpebrales amplias, retrognatia, polidactilia postaxial y anteposición anal.	Complejo COG, subunidad 6	614576	AR
COG7	Discapacidad intelectual, retraso en el crecimiento, anomalías cardíacas, convulsiones, epilepsia, hipotonía, hepatomegalia, hiperbilirrubinemia, ictericia, muerte prematura, micrognatia, microcefalia, cuello corto, pulgares aducidos, cutis laxa.	Complejo COG, subunidad 7	608779	AR
COG8	Discapacidad intelectual, epilepsia, convulsiones, hipotonía, letargo, mioclonos, estrabismo, microcefalia.	Complejo COG, subunidad 8	611182	AR
COPB2	Retraso psicomotor grave, falta de crecimiento, ceguera cortical, microcefalia, espasticidad.	COP-I subunidad beta 2	617800	AR
DOLK	Discapacidad intelectual, hipotonía, convulsiones, epilepsia, distrofia muscular, hiperqueratosis, ictiosis, infecciones en el tracto respiratorio, coagulopatía, cardiomiopatía, hipoglucemia, nistagmo, enanismo, microcefalia.	Dolicol cinasa	610768	AR
DPM1	Discapacidad intelectual, ataxia, hipotonía, convulsiones, epilepsia, ceguera, distrofia muscular, dificultad para tragar, discinesia. CK elevada, trigonocefalia, microcefalia, micrognatia, frente prominente, puente nasal alto, nistagmo, estrabismo, hipertelorismo.	Dol-P-Man transferasaI	608799	AR
DPM2	Discapacidad intelectual, convulsiones, hipoplasia cerebelosa, hipotonía, distrofia muscular. CK y transaminasas	Dol-P-Man transferasa2	615042	AR

	elevadas, trigonocefalia, microcefalia, micrognatia, hipotelorismo, nariz pequeña, paladar arqueado.			
DPM3	Discapacidad intelectual, episodio similar a un accidente cerebro vascular, miocardiopatía dilatada, distrofia muscular. CK elevada.	Dol-P-Man transferasa3	612937	AR
GCS1	Apnea, convulsiones, epilepsia, déficit cognitivo, dificultades en la ingesta de alimentos, hepatomegalia, hipotonía, inmunodeficiencias, trastornos de la respiración, escoliosis, anomalías craneofaciales, anomalías urogenitales.	Manosil-oligosacárido glucosidasa	601336	AR
GMPPA	Discapacidad intelectual, hipotonía, acalasia, alacrimia, sordera, anomalías de la marcha, espasticidad, hipohidrosis.	Subunidad α de la GDP-Man: pirofosforilasa	615510	AR
GMPPB	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, retraso en el habla, ataxia, disfunción retinal. CK elevada, microcefalia, malformaciones del cerebro y los ojos.	Subunidad β de la GDP-Man: pirofosforilasa	615350	AR
GFPT1	Síndrome miasténico congénito con agregados tubulares.	GlutaminaFructosa-6-P amidotransferasa I	610542	AR
MPDU1	Discapacidad intelectual, convulsiones, epilepsia, hipotonía, dermatitis, trastorno cutáneo similar a ictiosis, dificultades graves de alimentación, trastorno de la respiración, enanismo.	Dol-P-Man flipasa	609180	AR
NANS	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor severo de inicio infantil, displasia esquelética, braquicefalia, microcefalia, cara aplanada con nariz ligeramente grande, frente prominente, puente nasal hundido.	NANA sintetasa	610442	AR
NUS1	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, hipotonía, convulsiones, microcefalia, espasticidad, escoliosis	Subunidad de la cis-isoprenil transferasa	617082	AR

	congénita.			
OGT	Discapacidad intelectual, hipertelorismo, nistagmo, orejas bajas, nariz ancha, labios carnosos, pezón supernumerario, dedo del pie hipoplásico, retrognatia leve, dedos largos y delgados, clinodactilia, microcefalia, ambliopía y posible astigmatismo.	O-GlcNAc transferasa	300997	X R
PGM3	Discapacidad intelectual, atopia grave, aumento de los niveles séricos de IgE, autoinmunidad, inmunodeficiencia, ataxia, hiperreflexia de los tobillos.	Fosfoglucomutasa III	615816	AR
SEC23A	Defectos esqueléticos, displasia cráneo lenticulosutural, cataratas suturales, hipertelorismo, fontanelas de cierre tardío, nariz prominente, paladar hendido, macrocefalia.	COP II	607812	AR
SEC24D	Exoftalmos, fisuras palpebrales descendentes, fontanelas abiertas, raíz angular de la nariz, retrognatia, turricefalia.	COP II	616294	AR
SLC35A1	Discapacidad intelectual, ataxia, convulsiones, neutropenia, sangrado, trombocitopenia, afectación renal y cardíaca, occipital plano, hipertelorismo, ojos hundidos, filtrum corto, clinodactilia, hiperlaxitud articular.	Transportador de CMP-NeuAc	603585	AR
SLC35A2	Discapacidad intelectual, convulsiones, hipsarritmia, anomalías esqueléticas, hipotonía, extremidades acortadas, cejas gruesas, puente nasal ancho, labios gruesos, boca semiabierta y prognatismo maxilar.	Transportador de UDP-Gal	300896	SMo / X D
SLC35A3	Epilepsia, hipotonía, trastorno del espectro autista, artrogriposis, dislocación de cadera, microcefalia, retromicrognatia.	Transportador de UDP-GlcNAc	615553	AR

SLC35C1	Discapacidad intelectual, convulsiones, epilepsia, hipotonía, infecciones con neutrofilia, otitis, enanismo, microcefalia.	Transportador de GDP-Fucosa	266265	AR
SLC35D1	Condrodisplasia letal neonatal, displasia esquelética de miembros cortos.	Transportador de Golgi UDP-GlcA / UDP-GalNAc	269250	AR
SLC39A8	Discapacidad intelectual, retraso psicomotor, discapacidad visual, atrofia cerebelosa, hipotonía, convulsiones, estatura baja, hiperreflexia, estrabismo.	Transportador de manganeso	616721	AR
SRD5A3	Discapacidad intelectual, ataxia, hipotonía, ceguera, cifosis, coagulopatía, coloboma, discinesia, disfunción hepática, anemia, hipertrichosis, ictiosis, cataratas, malformaciones oculares y cerebrales, nistagmo.	Poliprenol reductasa	612379	AR
ST3GAL3	Discapacidad intelectual no sindrómica (NSID), espasmos infantiles, hipsarritmia.	N-acetilactosaminida α 2-3 sialiltransferasa	611090	AR
TMEM165	Anomalías oculares, displasia esquelética, epilepsia, espondilosis, hepatomegalia, hipotonía, osteoporosis, retraso en el crecimiento, retraso psicomotor, microcefalia, ptosis, orejas bajas, paladar alto, cuello corto y ancho, generalmente presentan estatura baja, cifosis escoliosis, cutis laxa.	Proteína transmembrana 165	614727	AR
TRAPPC11	Acalasia, alacrima, atrofia cerebral o fístula, distrofia muscular, retraso psicomotor, microcefalia, escoliosis, cataratas.	Subunidad de TRAPP (Complejo de partículas de proteínas de tráfico 11)	615356	AR
TRAPPC12	Retraso psicomotor, pérdida auditiva, hipsarritmia, hipotonía, microcefalia, escoliosis.	Subunidad de TRAPP (Complejo de partículas de proteínas de tráfico 12)	617669	AR
TRAPPC6B	Retraso psicomotor, características autistas, hipotonía, convulsiones, epilepsia, microcefalia, baja estatura.	Subunidad de TRAPP (Complejo de partículas de proteínas	617862	AR

		de tráfico 6B)		
TRAPPC9	Discapacidad intelectual, bruxismo, defectos en la mielinización, hipertelorismo, paladar hendido, incisivos superiores prominentes, cuello corto, dedos largos y delgados, microcefalia.	Subunidad de TRAPP (Complejo de partículas de proteínas de tráfico 9)	613192	AR
VPS13B	Discapacidad intelectual, neutropenia congénita intermitente, hipotonía, obesidad troncal, retinopatía progresiva, incisivos prominentes con boca abierta, hipoplasia maxilar, microcefalia, laxitud articular.	Proteína vacuolar de selección 13 homólogo B	216550	AR
Sin afectaciones en SNC				
ATP6V1A	Anomalías cardíacas, hipotonía, orejas prominentes, pequeñas fisuras palpebrales, cataratas, estrabismo, retrognatía, cutis laxa, microcefalia, cara triangular.	Subunidad A, dominio V1 de la V-ATPasa	617403	AR
ATP6V1E1	Anomalías cardíacas, estenosis pilórica, frente corta, blefarofimosis, estrabismo, entropión, hinchazón infraorbitaria, hipoplasia maxilar, apiñamiento de los dientes, mandíbula prominente, mejillas caídas, nares antevertidos, fístula larga, paladar medio, venas prominentes, testículos bilaterales no descendidos, micropene, camptodactilia, cutis laxa.	Subunidad E1, dominio V1 de la V-ATPasa	617402	AR
CHST6	Fotofobia dolorosa, nubes y erosiones corneales.	Queratán sulfato 6-O-sulfotransferasa	217800	AR
COPA	Artritis inflamatoria, enfermedad pulmonar intersticial, dificultad para respirar o tos, enfermedad renal mediada por complejos inmunitarios.	COP-I subunidad alfa	616414	AD
DHDDS	Retinitis pigmentosa en judíos ashkenazis, convulsiones, hipotonía axial, hipertonía periférica, hígado agrandado, criptorquidia, micropene.	Isoprenil transferasa	613861	AR

G6PC3	Anomalías cardíacas, infecciones recurrentes, neutropenia congénita grave, venas superficiales prominentes, hepatoesplenomegalia, microcefalia, plagiocefalia, pelo escaso del cuero cabelludo, hipoplasia de la parte media de la cara, paladar hendido.	Glc-6 fosfatasa	612541	AR
GNE	Debilidad muscular proximal y distal, desgaste de las extremidades superiores e inferiores, preservación del cuádriceps.	UDP-GlcNAc2 epimerasa/N-acetil-manosamina cinasa	605820	AR
PGM1	Cardiomiopatías, disnea, hepatopatía, hipertermia maligna, hipoglucemia, miocardiopatía dilatada, paro cardíaco, rabdomiólisis, trombosis, labio leporino, paladar hendido, úvula bífida.	Fosfoglucomutasa I	614921	AR
SAR1B	Retraso en el crecimiento, diarrea, esteatorrea.	GTPasa COP II	246700	AR
SEC23B	Anemia, colelitiasis, eritropoyesis interrumpida con eritroblastos multinucleados en la médula ósea, hiperbilirrubinemia, ictericia.	COP II	224100	AR AD
TGDS	Glosptosis, micrognatia, paladar hendido, hipertelorismo, cuello corto, clinodactilia, escoliosis.	TDP-Glc 4,6-deshidratasa	616145	AR
TMEM199	Aumento de las enzimas hepáticas y fosfatasa alcalina, deficiencias del factor de coagulación, disfunción hepática leve, hipercolesterolemia y baja ceruloplasmina.	Proteína transmembrana 199	616829	AR
TRAPPC2	Retraso psicomotor, artritis, baja estatura.	Subunidad de TRAPP (Complejo de partículas de proteínas de tráfico 2)	313400	X R
TRIP11	Acondrogénesis letal, osificación deficiente, turricefalia, puente nasal hipoplásico, cuello y tronco cortos, extremidades cortas y arqueadas, pie equinovaro.	Proteína de unión a microtúbulos asociada a Golgi	200600	AR

VMA21	Debilidad muscular progresiva, miopatía, enzimas hepáticas elevadas, CK elevada, paladar arqueado.	Proteína de membrana integral de ensamblaje de la V-ATPasa	310440	X R
-------	--	--	------------------------	-----

AR: Autosómica recesiva *AD*: Autosómico dominante. *XD*: Dominante ligado a X. *XR*: Recesivo ligado a X.

SMo: Mosaicismo somático

El estudio de cada grupo de CDG, ya sea debido a alteraciones de N u O-glicosilación, requiere de capítulos específicos. En este trabajo de tesis se profundizó en el estudio de los CDG que afectan la vía de formación de N-glicoproteínas.

1.2 N-Glicosilación

La N-glicosilación de proteínas es una modificación post-traducciona que implica la unión covalente de estructuras de carbohidratos al grupo amida de la cadena lateral de residuos de Asn, a una secuencia consenso (Asn-X-Ser/Thr) de la proteína a glicosilar, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina.

La síntesis de N-glicanos es ubicua y puede llevarse a cabo en diferentes compartimentos subcelulares, se inicia en el citoplasma, continua en el RE y finaliza en el Aparato de Golgi e implica una serie de pasos fundamentales: la formación de azúcares nucleótidos, la biosíntesis del oligosacárido que se unirá al dolicol-fosfato, la transferencia “en bloque” de la cadena de carbohidratos desde el dolicol-fosfato a la cadena polipeptídica nascente de la proteína, el remodelado de las uniones N-glicano-proteína en el RE y por último, la modificación del N-glicano en el Aparato de Golgi (Aebi, 2013).

1.2.1 Formación de N-glicoconjugados

El “core” o estructura glicosídica principal se ensambla en las primeras etapas que ocurren en citosol y RE, lográndose un tetra-deca-oligosacárido compuesto por tres moléculas de glucosa, nueve moléculas de manosa y dos residuos de N-acetilglucosamina ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$). El ensamblado ocurre con alto grado de especificidad en la cara citosólica del RE a partir de la acción de diversas glicosiltransferasas cuya función es la unión secuencial de glicanos provenientes de azúcares nucleótidos, a la cadena de oligosacáridos formada a partir de dolicol-fosfato (Dol-P) (**Figura 1**).

La segunda etapa es la unión o transferencia del core de glicanos mediante la acción del complejo oligosacaridil transferasa (OST), que se encuentra unido a la membrana del RE, que cataliza la unión covalente del núcleo a un residuo Asp localizado en una secuencia consenso (Asn-X-Ser/Thr) de la proteína a glicosilar. Inmediatamente después de la unión a la cadena polipeptídica, la glucosa (Glc) terminal y los residuos de manosa (Man) son removidos por glicosidasas y manosidasas aún en RE.

La vida media del oligosacárido unido a la proteína (G_3M_9) es muy corta, la glucosa más externa es removida luego de la transferencia del oligosacárido a la cadena polipeptídica nascente por la glucosidasa I (GI) dando origen a $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G_2M_9), luego las dos

glucosas restantes del oligosacárido son removidas por la glucosidasa II, produciendo Glc1Man9GlcNAc2 (G1M9) y Man9GlcNAc2 (M9). Finalmente, los residuos de Man son removidos por manosidasas presentes en el RE. Los oligosacáridos monoglicosilados (M9) también pueden producirse en el RE por actividad de la glicoproteína UDP-glucosa-glicosiltransferasa (UGGT), que transfiere una glucosa al oligosacárido M9, solamente si la glicoproteína aún no ha alcanzado su estructura terciaria nativa. Los N-glicanos monoglicosilados son reconocidos por lectinas/chaperonas del RE, calnexina (CNX) y calreticulina (CRT), esta interacción facilita el plegamiento de la proteína ya que evita la interacción del polipéptido con otro polipéptido, evitando así la formación de agregados y favorece la interacción con ERp57 (proteína disulfuro isomerasa que forma un complejo con CNX originando la formación de puentes disulfuros. Dicha interacción evita la salida temprana del RE de intermediarios y glicoproteínas mal plegadas. Una vez que la glicoproteína sea deglicosilada por GII, se rompe la interacción de la misma con CNX o CRT, y de acuerdo al estado de su plegamiento pueden ser re-glicosiladas por UGGT, o bien continuar su tránsito hacia la vía secretoria.

Si el proceso de plegado falla o es muy lento, uno o más residuos de Man son removidos por manosidasas presentes en el RE, esto disminuye la afinidad de la unión del glicano a CNX o CRT, lo que conduce a que la proteína mal plegada sea retro-tanslocada al citosol, poli-ubiquitinizada y degradada luego por el proteosoma.

En el caso de proteínas correctamente plegadas, los pasos posteriores son de remodelación de las cadenas de glicanos principalmente en Aparato de Golgi, donde residuos de Man son removidos y se agregan nuevos azúcares terminales como GlcNAc, ácido sálico (Sia), galactosa (Gal) y fucosa (Fuc), dando origen a diferentes estructuras de N-glicanos complejos (Hennet, 2012) (**Figura 1**).

resultantes de la falla en sintasas y 4debidos a alteración en enzimas glucosidasas(Jaeken& Péanne, 2017). Hay alteraciones de N-glicosilación provocados por defectos en receptores de acilasa y pirofosforilasa. También fueron reportados defectos en una chaperona, una desacetilasa, una epimerasa, una flippasa, una isomerasa, una quinasa, una reductasa y una transamidasa como causa de una clase de CDG diferente cada una (Jaeken & Péanne, 2017).

1.3.2 Presentación clínica

El espectro clínico observado en pacientes con desórdenes congénitos de N-glicosilación es muy variado, presentando la mayoría de ellos afectación multisistémica. Las manifestaciones neurológicas, gastrointestinales, renales, cardiovasculares, oftalmológicas y esqueléticas son las más frecuentes, pudiendo observarse un abanico de alteraciones bioquímicas entre las que se destacan al alteraciones hemostáticas, hepáticas e inmunológicas. También pueden cursar con defectos en piel y tejido conectivo. El fenotipo varía de inicio prenatal (hidropesía fetal con retraso del crecimiento intrauterino o miocardiopatía dilatada), hasta retraso leve del desarrollo global, disfunción cognitiva y ataxia que se manifiestan en los primeros años de vida (Al Teneiji et al., 2017).

Dentro de las clases más frecuentes de CDG debidas a alteración de N-glicosilación, podemos mencionar PMM2-CDG, PMI-CDG y MGAT2-CDG, patologías que presentan complicaciones severas, entre las cuales se destacan las alteraciones trombo-hemorrágicas, síndrome convulsivo de origen desconocido, hipotonía axial, regresión mental y motriz, lipodistrofia y/o mamilas invertidas (PMM2-CDG), con estudios complementarios positivos de alteración de la migración neuronal (Resonancia Magnética Nuclear demostrativa de hipoplasia cerebelosa, fondo de ojos con retinitis pigmentaria, etc.) (Briones et al., 2002; Jaeken, 2004; Noelle et al., 2005; Asteggiano et al., 2018).

1.3.2.1 PMM2-CDG

Fue el primer CDG descrito en 1980 por el Prof. Dr. Jaak Jaeken. El gen *PMM2* codifica la proteína fosfomanomutasa (EC5.4.2.8) (<https://www.brendaenzymes.org/enzymes.php?ecno=5.4.2.8>), una enzima necesaria para la síntesis de GDP- manosa. Variantes patogénicas causan PMM2-CDG, un trastorno panétnico, de herencia autosómica recesiva con una incidencia estimada a nivel mundial de 1:20.000 (Altassan et al., 2019).

Este defecto en las primeras etapas citosólicas de la vía de N-glicosilación de proteínas, se caracteriza por la deficiencia de la enzima fosfomanomutasa 2, que cataliza la conversión de manosa-6-fosfato a manosa-1-fosfato, que es un precursor del difosfato de guanosinamano (GDP-Man) y dolichol-P-mano (Dol-Man) (Altassan et al., 2019; Péanne et al., 2017). Estos dos compuestos son los donantes de manosa utilizados en el retículo endoplásmico (ER) para la síntesis del *core* o núcleo de oligosacáridos que se unirá al dolicol. La deficiencia de GDP-Man y Dol-P-Man causa hipoglicosilación de numerosas glicoproteínas, incluidas las glicoproteínas séricas (enzimas lisosomales y proteínas de transporte) y glicoproteínas de membrana. La presentación clínica y el inicio de PMM2-CDG varía desde una presentación prenatal grave con afectación multisistémica hasta presentación adulta leve (Altassan et al., 2019; Péanne et al., 2017; Jaeken et al., 1997). Existen protocolos en la actualidad, que a partir del seguimiento de pacientes con diagnóstico de PMM2-CDG, permiten profundizar sobre el conocimiento de su fisiopatología, la variabilidad de la severidad de la enfermedad y el curso de la misma durante las diferentes etapas de la vida (Altassan et al., 2019).

Merece una mención especial en este trabajo de tesis, las manifestaciones hemostáticas y en particular las alteraciones en la agregación plaquetaria que se observan muy frecuentemente en pacientes CDG (especialmente PMM2-CDG), y que en conjunto con las alteraciones inmunológicas, son una de las causas más frecuentes de descompensación y muerte de pacientes CDG (Van Geet et al., 2001; Brasil et al., 2018; Pascoal et al., 2020).

Dentro de las manifestaciones trombo-hemorrágicas, las alteraciones en la agregación plaquetaria asociadas a la disminución de la respuesta a agonistas (como por ejemplo colágeno, ADP y ristocetina, entre otros), son el principal blanco de estudio en la profundización de las manifestaciones fisiopatogénicas severas de estas patologías (Morava et al., 2008; De La Morena-Barrio et al., 2014; Van Geet et al., 2001).

En su génesis, las plaquetas derivan de los megacariocitos, y su principal función es participar de la hemostasia primaria, en condiciones basales, se deslizan suavemente sobre el endotelio vascular intacto, sin embargo, cuando hay una lesión en el mismo interactúan rápidamente para formar el tapón plaquetario (Mammadova-Bach et al., 2020). Las anomalías de este sistema hemostático primario pueden conducir a un estado hemorrágico grave o a una trombosis excesiva e insuficiencia vascular (Linssen et al., 2013; Mammadova-Bach et al., 2020). Para cumplir estas funciones, las plaquetas cuentan con numerosas glicoproteínas (GPIb/IX/V, GPIIb/IIIa), cada una de ellas clave en el proceso

hemostático (Phillips, 1988; De La Morena-Barrio et al., 2014; Li et al., 2018). Sin embargo, poco o nada se ha profundizado en el conocimiento del efecto de la hipoglicosilación sistémica en otras glicoproteínas de membrana plaquetaria que pudieran estar involucradas directa o indirectamente en el mecanismo de acción plaquetario afectado en pacientes CDG.

1.3.2.2 ALG2-CDG

Mutaciones en el gen *ALG2*, que codifica la enzima alfa 1,3 manosiltransferasa (EC 2.4.1.131) (<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.131>), ocasionan un tipo de CDG I denominado ALG2-CDG. Esta enzima es responsable de transferir un residuo de Man desde GDP-Man al core de N-glicanos en formación (Man1GlcNAc2-PP-dolichol) (Thiel et al., 2003). Los pacientes con ALG2-CDG tienen un trastorno multisistémico con discapacidad mental, coloboma del iris, hepatomegalia, anomalías de la coagulación y mielinización defectuosa (Asteggiano et al., 2018).

El primer caso de ALG2-CDG, fue descrito por Thiel et al (2003), también se asociaron mutaciones en el gen *ALG2* al Síndrome Miasténico Congénito (Cossins et al., 2013). La variante detectada en dos pacientes consanguíneos, en el gen *ALG2* (p.Val68Gly) reduce severamente la expresión de la proteína tanto en el músculo del paciente como en células en cultivo. Además, de *ALG2*, defectos en los genes *DPAGT1* y *ALG14* son causa del Síndrome Miasténico Congénito asociados a CDG, lo que demuestra que la N-glicosilación de proteínas desempeña un papel importante para el correcto funcionamiento de la unión neuromuscular (Cossins et al., 2013; Evangelista, Hanna & Lochmüller, 2015).

1.4 Detección y caracterización de pacientes CDG

1.4.1 Screening Bioquímico

La técnica de elección hasta el momento o *Gold Estándar* para el cribaje de defectos de N-Glicosilación es el isoelectroenfoque de transferrina sérica (IEF-Tf). Este método se basa en el estudio de las isoformas glicosiladas de glicoproteínas séricas, la más empleada es la separación electroforética de las isoformas de transferrina sérica en función de sus diferentes cargas negativas determinadas por el número de residuos de ácido siálico terminal de las cadenas de N-glicanos unidos. En un parón normal, la isoforma mayoritaria es la

tetrasialotransferrina. A partir de este estudio podemos observar e inferir dos patrones anormales de IEF-Tf en pacientes con sospecha de CDG (**Figura 2**):

- Patrón Tipo I (CDG-I): con disminución de tetrasialotransferrina y aumento de disialotransferrina y asialotransferrina, asociado a alteraciones en genes que afectan proteínas cuya función está relacionada al ensamblaje del core de glicanos o su transferencia a la cadena polipeptídica, siendo la ubicación de estos defectos principalmente en RE (Péanne et al., 2017) (**Figura 2**).
- Patrón Tipo II (CDG-II): presenta incremento de las isoformas tri-, di y a- sialiladas de la transferrina, pudiendo observarse incluso aumento de todas las isoformas hiposialiladas, lo que sugiere un defecto de remodelado de las cadenas de glicanos en Aparato de Golgi (Péanne et al., 2017) (**Figura 2**).

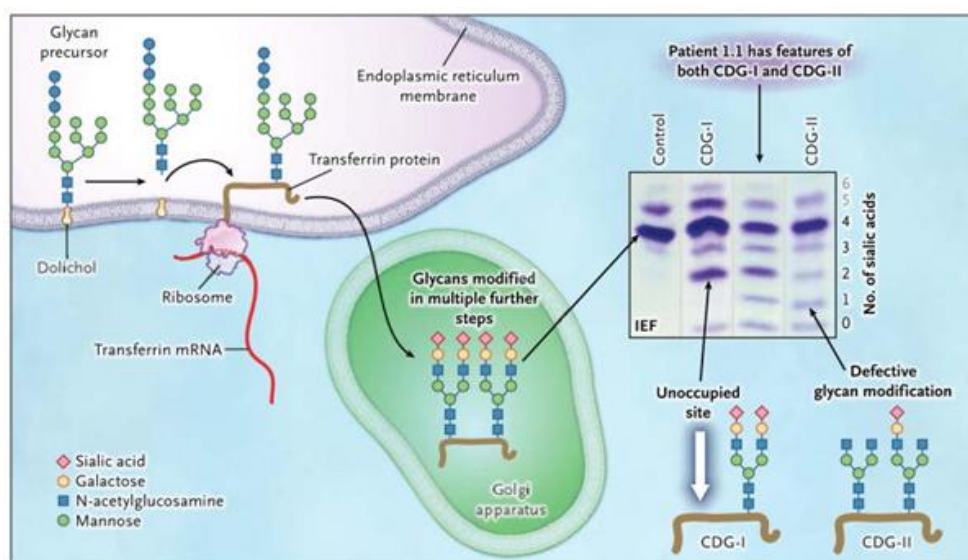


Figura 2. Screening bioquímico de CDG mediante el análisis de transferrina
(Adaptado de Tegtmeier et al.) (L.C. Tegtmeier et al., 2015).

Si bien esta metodología ha sido considerada de elección para la detección de pacientes con CDG, se han descrito perfiles de Tf alterada debido a otras enfermedades metabólicas, tales como fructosemia, galactosemia, colagenosis; que son consideradas alteraciones secundarias de la transferrina (Asteggiano et al. 2018). Igualmente, se ha encontrado un patrón de Tf alterado en otras situaciones como inmadurez hepática en recién nacidos o alteraciones hepáticas agudas o crónicas (Murawaki et al., 1997), infecciones por bacterias con actividad sialidasa, Síndrome Urémico Hemolítico o exposición fetal por alcoholismo materno (Loos

et al., 2002). Así mismo, cabe destacar que se han descrito determinados tipos de CDG que cursan con perfil normal de IEF-Tf: GMPPA-CDG, GMPPB-CDG, TUSC3-CDG, MOGS-CDG, GANAB-CDG, PRKCSH-CDG, FUT8-CDG, GNE-CDG, NANS-CDG, DHDDS-CDG, SLC35A1-CDG, SLC35A3-CDG, SLC35C1-CDG, SEC23B-CDG, PGM3-CDG (Francisco et al., 2019). Han sido reportados determinados tipos de CDG pueden presentar un IEF-Tf normal de manera excepcional (ALG13-CDG, PMM2-CDG, RFT1-CDG, SRD5A3-CDG y SLC35A2-CDG) para lo cual ante la sospecha clínica sostenida es recomendable repetir el estudio en diferentes oportunidades (Francisco et al., 2019).

En caso de que las isoformas de transferrina presenten un patrón tipo II, es complementario evaluar la sialilación de la O-glicoproteína sérica Apolipoproteína CIII (ApoCIII), para determinar si se trata de un defecto de N-glicosilación o de un defecto combinado de N y O-Glicosilación (Wopereis et al., 2003).

Las isoformas de transferrina también pueden evaluarse por métodos cuantitativos, como Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) o Electroforesis capilar, los métodos acoplados a detección con espectrometría de masa prevén un detalle preciso de la composición de las cadenas de glicanos afectadas, principalmente en pacientes con patrón CDG tipo II (Francisco et al., 2019).

Debido a que el espectro clínico de estas patologías es muy amplio, el algoritmo diagnóstico es complejo y multidisciplinario. En los últimos años la comunidad científica puso especial énfasis en mejorar las metodologías existentes y desarrollar nuevas herramientas metodológicas para facilitar su diagnóstico. Es así que se desarrollaron métodos para evaluar afectaciones en las distintas etapas de N-glicosilación tales como el análisis de dolicoles o glicanos unidos a transferrina, en suero y orina por HPLC o espectrometría de masas, como así también dosajes enzimáticos para las clases más frecuentes de CDG (PMM2, MPI) (Péanne et al., 2017). Debido a que estos métodos son complicados de desarrollar, ya sea por un impedimento metodológico o bien por el procesamiento de las muestras necesarias, se tiende a avanzar al diagnóstico genético cuando se observa un perfil de transferrina CDG tipo II con o sin perfil de ApoCIII alterado (Francisco et al., 2019; Péanne et al., 2017; Abu Bakar et al., 2018; L.C. Tegtmeyer et al., 2015).

N- La mayoría de las alteraciones de glicosilación son sub-diagnosticadas o no detectadas y en general la situación social del paciente pasa ser crónica en la búsqueda de respuestas en las diferentes especialidades médicas por largos periodos de tiempo (Marklová & Albahri, 2007; Morava et al., 2008; Jaeken 2010; Bistue et al., 2011; Morava et al., 2015).

1.4.2 Diagnóstico Genético

1.4.2.1 Secuenciación de Sanger de Genes Candidatos

La secuenciación Sanger es una herramienta muy útil en el diagnóstico de CDG, principalmente cuando se observan signos patognomónicos de las clases más frecuentemente descritas de esta patología. En aquellos casos en los cuales se observa patrón de IEF-Tf alterado tipo I, y las manifestaciones clínicas son sugestivas de PMM2-CDG (mamilas invertidas, distribución anormal de tejido graso o “*fat-pads*”, hipoplasia cerebelosa, estrabismo, convulsiones) y el patrón de IEF-Tf es tipo I, se procede a la secuenciación Sanger del gen *PMM2*. En los últimos años, el aumento de pacientes cuya sospecha clínica es de CDG y difícil de definir fenotípicamente, ha puesto de manifiesto la necesidad de implementar estrategias de estudio genético que comprenden la utilización de técnicas de Secuenciación masiva de genes para poder arribar a un diagnóstico certero en cortos plazos (Francisco et al., 2019).

1.4.2.2 Secuenciación masiva de genes (NGS)

Los CDG a menudo son difíciles de diagnosticar clínicamente porque carecen de uniformidad en el fenotipo. Sin embargo, los recientes avances tecnológicos en la secuenciación masiva de genes (NGS), han significado una gran mejora en el algoritmo diagnóstico de estas patologías, como así también han permitido la identificación de nuevos genes implicados en alteraciones de N-glicosilación (Ng & Freeze, 2018).

NGS es un método de estudio de mutaciones germinales (heredadas) o somáticas (adquiridas) que permite el análisis conjunto de muchos genes que se secuencian simultáneamente en una única reacción, por lo que esta metodología es capaz de proporcionar respuestas a escala genómica en un tiempo corto. El desarrollo de algoritmos de análisis de datos y la interpretación de los resultados en la actualidad son el mayor desafío de la NGS (Buermans & den Dunnen, 2014).

La metodología en la que se basan la mayoría de las aproximaciones de NGS de ADN consiste en una fragmentación de la muestra, preparación de las librerías, amplificación y secuenciación (**Figura 3**) (Ambardar et al., 2016). Además, puede realizarse una etapa opcional de captura antes de la amplificación para enriquecer la librería en las regiones de interés. No obstante, la metodología de secuenciación subyacente y de preparación de la

librería es propia de cada plataforma comercial. A continuación se detalla cada una de las etapas (Muzzey et al., 2015; Ambardar et al., 2016; Slatko et al., 2018)(**Figura 3**).

Fragmentación del ADN y formación de la librería

En primer lugar, se parte de una muestra de ADN que se somete a fragmentación al azar y a continuación se une ADN sintético a ambos extremos de cada fragmento (Slatko et al., 2018; Ambardar et al., 2016). Este ADN sintético denominado “adaptador” contiene secuencias universales complementarias a los oligonucleótidos que se van a emplear posteriormente en la amplificación y en la secuenciación y 6-8 pb que se utilizan como código de barras o índice identificativo de la muestra (indexado) (Slatko et al., 2018). Los fragmentos así preparados se llaman templados y su conjunto forma una librería que, además, puede ser enriquecida en aquellos templados que contienen las regiones de interés (Ambardar et al., 2016).

Enriquecimiento de la librería y amplificación

El enriquecimiento de la librería o etapa de captura de las regiones de interés se puede realizar con sondas unidas a biotina que se purifican con avidina o con sondas inmovilizadas en un array. Posteriormente, los templados se amplifican clonalmente y se agrupan (clustering) por PCR en emulsión (emPCR) o por amplificación en puente en fase sólida y finalmente se secuencian (Bahassi & Stambrook, 2014; Ambardar et al., 2016)

Secuenciación

Según la plataforma utilizada, la secuenciación puede ser por síntesis utilizando nucleótidos en cuya base nitrogenada tienen unido un fluoróforo que se detectan durante la copia del templado, por secuenciación a tiempo real con nucleótidos marcados con fluoróforos en la cadena de fosfatos, por ligación con sondas complementarias marcadas con fluoróforos, por pirosecuenciación donde se registra de manera indirecta el pirofosfato liberado tras la unión del nucleótido complementario, por cambios en el pH producidos al liberarse un protón tras la unión del nucleótido complementario o por cambios en la conductividad que se producen al pasar una hebra de ADN por un nanoporo de una membrana polimérica (Metzker, 2009; Ambardar et al., 2016; Gupta & Verma, 2019). No obstante, existen otros métodos de secuenciación masiva alternativos que utilizan otras aproximaciones (Koboldt et al., 2013; Bahassi & Stambrook, 2014).

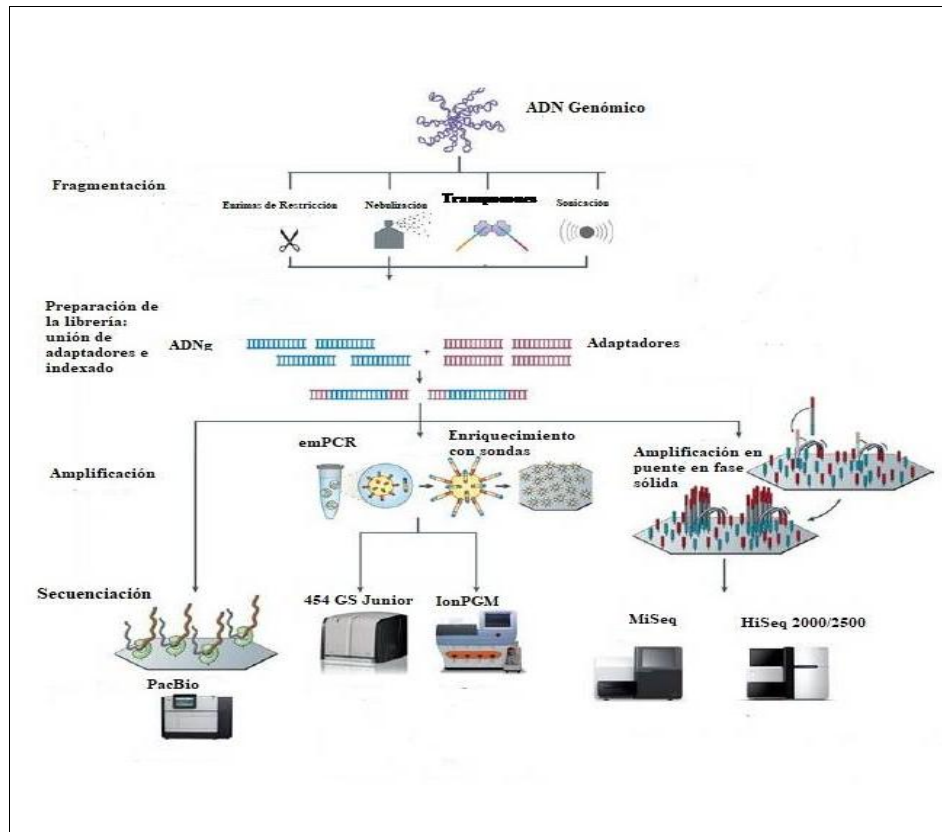


Figura 3. Etapas de preparación de la muestra para la secuenciación masiva.

Adaptada de Loman et al 2012.

Procesamiento de datos y parámetros de calidad

La información obtenida del secuenciador contiene el conjunto de secuencias de las muestras analizadas. Cada una de estas secuencias se denomina lectura o *reads* (Buermans & den Dunnen, 2014). Esta información contenida en un archivo debe ser procesada mediante una serie de herramientas bioinformáticas con el fin de obtener un archivo de variantes para su análisis e interpretación (**Figura 4**). Las lecturas generadas por el secuenciador en formato BCL son procesadas con el fin de determinar la muestra de origen de cada una de ellas a partir del índice (*demultiplexing*) y eliminar la secuencia correspondiente al adaptador (*trimming*) (Koboldt et al., 2013; Yohe & Thyagarajan, 2017). El archivo obtenido tras este proceso tiene el formato FastQ. Las lecturas son alineadas frente una secuencia de referencia y se exportan a un archivo de datos tipo BAM / SAM. El análisis del archivo BAM permite comparar la secuencia de referencia con la de las lecturas y detectar aquellas variantes que difieren respecto de la referencia (*variant calling*) (Gargis et al., 2015; Muzzey et al., 2015). Estas variantes suelen denotarse como SNV, de las siglas en inglés *Single Nucleotide Variant*. La compilación de los datos con algunas bases de datos

contrastadas permite obtener información adicional sobre las variantes detectadas (anotación de variantes). El archivo de salida tras este análisis es un VCF (*Variant Calling File*) y es el que se emplea principalmente en el posterior análisis cuando se integran estos resultados con los datos clínicos y bioquímicos del paciente (Bahassi & Stambrook, 2014; Muzzey et al., 2015).

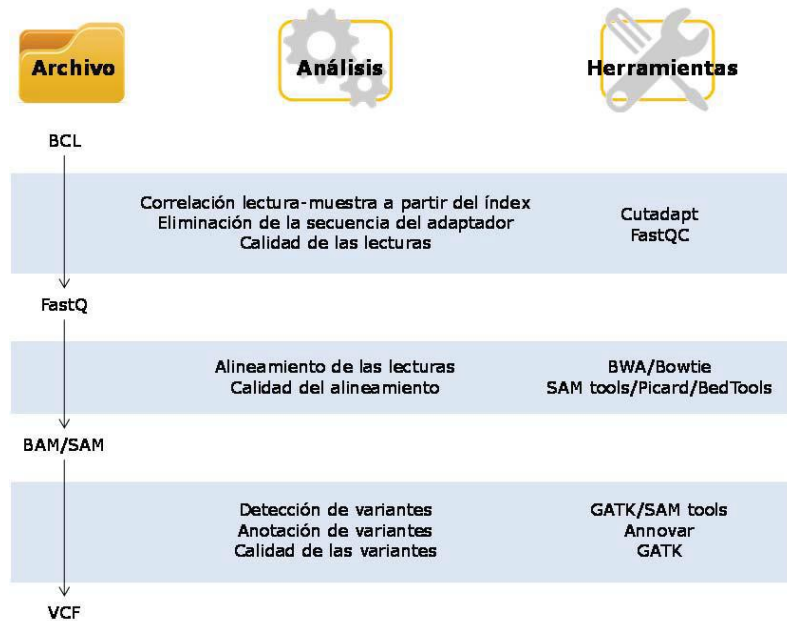


Figura 4. Esquema del procesamiento de datos.

Durante el procesamiento de los datos obtenidos de secuenciación masiva se miden parámetros de calidad a tres niveles distintos:

- Calidad de las bases de las lecturas: Se determina el nivel de fiabilidad de que la base leída sea correcta según la relación señal/ruido. por lo general, se considera que una base tiene calidad suficiente cuando tiene un 99% de precisión (Ewing et al., 1998).
- Calidad del alineamiento de las lecturas frente al genoma de referencia: por lo general, la secuenciación se realiza a partir de ambos extremos del templado de tal manera que para un mismo fragmento tendremos una lectura *forward* (*F*) y una *reverse* (*R*) dando lugar a lecturas apareadas o *paired-end*. En la evaluación de la calidad del alineamiento se concatenan las lecturas provenientes de un mismo fragmento y se comprueba que poseen la distancia entre ambas y la orientación esperada. Además, se determina el número de veces que alinea una lectura en el genoma de referencia y si esta está duplicada.

- Calidad de las variantes o SNV: Se estipula que una variante es real cuando está representada en más de un 15% de las lecturas totales. Además, se comprueba que la variante está igualmente representada en lecturas F y R. En caso contrario, se considera un sesgo de hebra o *strand bias* y se descarta la variante (Park & Kim, 2016).

Tras el procesamiento bioinformático de los datos obtenidos del secuenciador y haber aplicado los filtros de calidad descritos, se procede al análisis e interpretación de los resultados integrando la información del archivo VCF con los datos clínicos y bioquímicos del paciente. Además, en ocasiones es necesario recurrir al archivo BAM para revisar los alineamientos de las secuencias el número de veces que está leída una posición del genoma se denomina “profundidad de cobertura” (DC, *depth of coverage*). Por lo general, se consideran una DC mínima de 10-20x para poder detectar SNV en heterocigosis con precisión (Gargis et al., 2015). Ante una variante respecto del genoma de referencia se calcula la relación entre el número de veces que se ha leído la variante frente al DC de esa posición y de esta manera se define si la variante está en homocigosis (>80%) o en heterocigosis (15-80%). Es importante no confundir el término “profundidad de cobertura” con “cobertura horizontal”. Esta última hace referencia al número total de pares de bases de las regiones de interés a secuenciar (*targets*). Durante el análisis de las variantes se realizan estudios *in-silico* y se consultan bases de datos contrastadas con el fin de poder clasificar las variantes como mutaciones causantes de enfermedad, polimorfismos o variantes de significado incierto (VUS, *variant of unknown significance*). Además, en ocasiones será necesario complementar el análisis con estudios funcionales (Gupta & Verma, 2019; Buermans & den Dunnen, 2014).

OBJETIVOS

Objetivo General

El *objetivo general* de este trabajo de tesis es aportar nuevos conocimientos respecto a las bases moleculares de los Desórdenes Congénitos de la Glicosilación en seres humanos profundizando en los aspectos glicómicos relacionados a la regulación de mecanismos fisiopatogénicos asociados a estas patologías.

Objetivos Específicos

Los objetivos específicos han sido desarrollados y organizados respecto a dos subtemas: *Capítulo I*, orientado al estudio de defectos genéticos en la biosíntesis de N-glicoproteínas mediante la identificación de los genes afectados para CDG y el posible hallazgo de nuevos genes; y el *Capítulo II*, dirigido específicamente a la caracterización glicómica en pacientes CDG, centrándonos en la caracterización de ALG2-CDG con una nueva variante en homocigosis.

Por esto los objetivos específicos son:

Capítulo I

1) Estudiar las bases moleculares de pacientes con desórdenes congénitos de la N-glicosilación.

1.1) Identificar alteraciones de N-glicoproteínas en pacientes con sospecha clínica de CDG.

1.2) Identificar variantes génicas en pacientes con alteración de N-glicoproteínas.

1.3) Validar la variante génica detectada en pacientes ALG2-CDG

Capítulo II

1) Estudiar el perfil glicómico en tejido sanguíneo de pacientes CDG.

1.1) Caracterizar el perfil estructural de N-glicanos totales en suero de pacientes ALG2-CDG.

1.2) Describir cualitativamente el perfil de N-glicanos en membrana plaquetaria de pacientes PMM2-CDG.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Inclusión de sujetos al estudio

Este trabajo de tesis forma parte de una línea de estudio de CDGs que comenzó a desarrollarse en el año 2005 en CEMECO, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad. El proyecto de tesis y los documentos asociados a los aspectos éticos, fueron evaluados y aprobados por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CIEIS) dependiente del Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba, Argentina según el Acta N° 95/2005/2007/2016. El estudio se realizó de acuerdo con los estándares éticos establecidos en la Declaración de Helsinki de 1964 y sus enmiendas posteriores o estándares éticos comparables. Los sujetos de investigación ya sean individuos con sospecha clínica de alteración de la glicosilación y/o individuos controles normales sin patología, fueron comunicados y se solicitó la firma de un Consentimiento Informado al paciente y/o familiares directos y/o tutores de menores de edad para pacientes vulnerables debidos a diferentes grados de incapacidad neurológica.

Criterios de inclusión y exclusión de pacientes al estudio

Criterios de Inclusión: los individuos incluídos en el estudio fueron derivados por médicos especialistas en metabopatías congénitas (pertenecientes a CEMECO y grupos de especialistas colaboradores), y presentaron tres o más manifestaciones clínicas asociadas a CDG, principalmente retardo madurativo e hipotonía axial en combinación con alguno de los siguientes hallazgos:

- Disfunción hepática (a excepción de hepatopatías crónicas)
- Hipoplasia cerebelar/atrofia
- Coagulopatía con baja concentración en suero de factores IX y XI, proteína C, antitrombina III y/o proteína S
- Hipotiroidismo, hipogonadismo
- Esotropía
- Efusión pericárdica
- Adiposidades subcutáneas localizadas (suprepública, mamilas invertidas)
- Convulsiones
- Eventos cerebro vasculares
- Osteopenia, escoliosis
- Retinitis pigmentosa

- Escoliosis progresiva, entre otras manifestaciones (Rymen & Jaeken, 2014; Freeze et al., 2012; Martínez-Duncker et al., 2012).

Criterios de Exclusión:

Los criterios de exclusión de pacientes en este estudio fueron aquellos que presentaran patologías metabólicas que producen hipoglicosilación de transferrina no debida a CDG, denominadas “alteraciones secundarias de la glicosilación” que ocasionan falsos positivos, por ej. galactosemia, fructosemia. También pacientes que presentaran hepatopatías crónicas, síndrome urémico hemolítico, u otras patologías infecciosas bacterianas.

Obtención, procesamiento y conservación de muestras biológicas

Muestras de sangre periférica fueron extraídas y procesadas para obtención de plasma o suero, plaquetas y/o ADN genómico y Plasma rico en plaquetas (PRP) mediante procedimientos de rutina en nuestro laboratorio (Asteggiano et al. 2018). Se ingresaron al estudio muestras biológicas de pacientes derivados de otros centros de salud de nuestro país y el exterior, según criterio médico. Las muestras de suero/plasma y ADN se conservaron de acuerdo a las condiciones óptimas de almacenamiento (congeladas a -20°C) durante el tiempo acordado por consentimiento informado.

Obtención del plasma rico en plaquetas (PRP)

Un volumen de 8 mL de sangre periférica anticoagulada con citrato de sodio al 3,8% (0,109 M) (dilución 1:10), fueron centrifugados 15 minutos a 200xg para obtener PRP (fase acuosa superior) que contiene aproximadamente el 70% de las plaquetas presentes en la muestra original. Para el análisis por citometría de flujo, se añadió para-formaldehído a una concentración final del 1% para fijar las plaquetas y evitar su activación durante la siguiente etapa de centrifugación de 10 minutos a 900 x g. Finalmente, el sedimento de PRP se resuspendió en buffer fosfato salino (PBS) pH=7,4 a una concentración final de plaquetas de $2 \times 10^5 \text{ cel/mm}^3$.

Metodología

1.0 Análisis de isoformas N-glicosiladas de proteínas séricas

1.1 Isoelectroenfocado de Transferrina

La metodología para el diagnóstico de CDG se basa en la determinación de los cambios bioquímicos que se expresan en las glicoproteínas hipoglicosiladas (Francisco et al., 2019). Estas alteraciones pueden ser observadas, entre otras metodologías, por isoelectroenfocado de proteínas séricas (IEF), técnica que permite analizar la separación de las isoformas de glicoproteínas a partir de sus puntos isoeléctricos (pI). La hipoglicosilación puede ser determinada, debido a que la adición o la pérdida de un residuo de ácido siálico, produce una variación del pI en 0,1 unidades de pH, por cada molécula de ácido siálico terminal disminuida. Un defecto en la síntesis de los N-glicanos da lugar a una incorporación deficiente de ácido siálico causando una desviación hacia el cátodo en el perfil de IEF. El estudio de transferrina por esta metodología (IEF-Tf) ha sido ampliamente descrita (Jeppsson & Kristensson, 1993; Renner & Kanitz, 1997). Los patrones de IEF que se pueden observar en la separación de las isoformas de Tf son: el Tipo I (CDG-I), que se caracteriza por una disminución de tetrasialo-Tf y un aumento de disialo-Tf y asialo-Tf, y el Tipo II (CDG-II), en el cual se observa un incremento de trisialo-Tf y monosialo-Tf principalmente. El patrón normal se observa con la isoforma tetrasialotransferrina como mayoritaria. El IEF-Tf es la metodología más utilizada para el estudio bioquímico en pacientes con sospecha clínica de CDG y permite correlacionar el patrón de migración observado, con la localización del posible defecto metabólico dentro de la célula (Stibler & Jaeken, 1990; Wopereis et al., 2003). Para la realización del IEF-Tf, las muestras de suero fueron centrifugadas y el sobrenadante resultante se incubó durante 30 minutos con citrato férrico (10mM) en solución fisiológica, para saturar las isoformas de transferrina.

El IEF-Tf se realizó en una unidad de electroforesis automatizada *Phast-System* (GE Healthcare), utilizando geles *PAG plate* pH: 4,0-6,5 (GE Healthcare). Las isoformas fueron separadas durante aproximadamente 2 horas, según el siguiente método: *Prefocusing*: 200V / 2.0mA / 0.5 W; *Sample Application* a 100V / 1mA / 0.5W y *Focusing* a 200V / 2mA / 1W. Retirado el gel, se procedió a inmunofijar las proteínas en el gel con el anticuerpo específico IgG de conejo anti-transferrina BUR134 (donado por el Dr. Hudson Freeze, Sandford Children Hospital, San Diego, California, EE.UU), durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, se lavó *overnight* (O/N) con solución fisiológica a temperatura ambiente. Seguidamente se

realizó tinción con *Coomasie blue* por 5 minutos, para la visualización de las isoformas de la transferrina. El gel se incubó luego con una solución de destañir (metanol/ácido acético/Agua 35:10:55), hasta la visualización colorimétrica de las bandas. Los puntos isoeléctricos (pI) que coinciden con la migración para cada una de las isoformas analizadas fueron: tetrasialo-Tf (pI: 5,4), trisialo-Tf (pI: 5,5), disialo-Tf (pI: 5,7), monosialo-Tf (pI: 5,8) y asialo-Tf (pI: 5,9). (Bistue et al., 2011; Asteggiano et al., 2018).

1.1.2 Detección de polimorfismos en la transferrina

La presencia de polimorfismos proteicos en Tf puede ocasionar un perfil anómalo en la migración de las isoformas por IEF-Tf principalmente asociado a un perfil de IEF-Tf CDG tipo II. Por tal motivo, cuando se observaron estos perfiles, se repitió el IEF realizando previamente una digestión del suero con la enzima neuraminidasa, que elimina los residuos de ácido siálico terminales, único azúcar responsable de la carga negativa del glicano. El suero se incubó con citrato férrico, bicarbonato Sódico (0,1M) y 10 uL de enzima neuraminidasa (1mg/ml) (SIGMA) a 37°C O/N. Una vez finalizada la digestión, las muestras se diluyeron 1/400 vol/vol en solución fisiológica y se realizó la separación por IEF. Los resultados se valoraron de forma cualitativa por comparación con el patrón de IEF-TF de suero control normal.

1.1.3 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (EC) es considerada una tecnología intermedia entre la electroforesis de zona en soporte y la cromatografía líquida. (Schellenberg & Wielders, 2010). La cuantificación de isoformas de transferrina en muestras de suero se realizó en el equipo automatizado Capillarys (Sebia) utilizando el kit comercial Capillary CDT (Sebia). El sistema usa el principio de la electroforesis capilar en solución libre, que representa la forma más corriente de electroforesis capilar. Permite la separación de moléculas cargadas en función de su movilidad electroforética propia en un tampón de pH según el pH del electrolito (Schellenberg & Wielders, 2010). La separación se realiza, a partir de la inyección en los capilares de la muestra y aplicando a continuación una diferencia de potencial de varios miles de voltios en los extremos de cada capilar. Las isoformas de la transferrina, separadas en capilares de sílice fundido, son detectadas en el capilar mediante espectrometría de absorbancia a 200 nm. La detección directa proporciona automáticamente el porcentaje de transferrina deficiente en carbohidratos (CDT) calculado respecto a la cantidad total de transferrina detectada. Con el tampón usado de pH alcalino, el orden de

migración de las isoformas de la transferrina es el siguiente: asialotransferrina, disialotransferrina, trisialotransferrina, tetrasialotransferrina y pentasialotransferrina (Schellenberg & Wielders, 2010).

2.0 Análisis genéticos

2.1 Extracción de ADN genómico (ADNg)

El ADNg se obtuvo a partir de la fracción leucocitaria extraída de 5 ml sangre periférica, en tubos conteniendo 0,5 ml de 0,1 M EDTA o a partir de cultivo de fibroblastos humanos. La extracción de ADNg se llevó a cabo con un *kit* comercial de extracción (*Wizard Genomic Purification Kit, PROMEGA*). El ADNg fue conservado a -20°C durante el transcurso de este estudio.

2.1 Búsqueda de alteraciones genéticas en pacientes con defectos de N-Glicosilación proteica.

A partir de la sospecha clínica y bioquímica (IEF-Tf y/o CE), la búsqueda de mutaciones de en los genes responsables de las clases de CDG más frecuentes (*PMM2*, *MPI* entre otras) se realiza mediante amplificación utilizando la técnica de *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (PCR) y posterior secuenciación de Sanger (Matthijs et al., 1998).

2.1.1 Genotipado de PMM2: a partir de muestras de ADNg se realizó el estudio del gen *PMM2*, mediante amplificación por PCR y secuenciación por el método de Sanger. En base a la secuencia genómica, se diseñaron cebadores para amplificar los 8 exones del gen *PMM2*, incluyendo por lo menos 50 pb de las regiones intrónicas flanqueantes (Tabla V). Se utilizaron 200 ng de ADNg en un volumen final de 50 µl, conteniendo 0.5 µL Go Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 10 µl del buffer mix de reacción 5X, una concentración final de cada primer de 100 nM y una concentración final de 200 uM de dNTPs. Las condiciones de reacción fueron: 5 min a 94°C, luego 35 ciclos de 30seg a 94°C, 40 seg a T_m y 45 seg a 72°C; seguido de 2 min a 72°C. La separación de los productos de PCR amplificados se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (1-2%) según el tamaño de los fragmentos y tinción del ADN con bromuro de etidio. El producto de PCR fue purificado mediante *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA)*. Las reacciones de secuencias se llevaron a cabo utilizando el *Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing v2.0 (Abi Prism. PE Applied biosystems, UK)*. Las secuencias

se examinaron en un analizador “ABI PRISM 3700 DNA analyzer” de PE Applied Biosystems. El análisis de secuencias se realizó mediante el paquete informático DNA baser (<https://www.dnabaser.com/>). La secuenciación de los productos de PCR purificados fue realizada en la unidad Genómica del Instituto de biotecnología C.I.C.V. y A, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en Buenos Aires-Argentina.

Tabla V: Secuencia de los cebadores *forward* (F) y *reverse* (R) utilizados para la amplificación de los 8 exones del gen *PMM2*

Exón	CEBADORES	Temperatura de fusión (Tm)	Tamaño fragmento amplificado
1	F: 5'-GTG CCA ACG TGT CTT GTA AG-3' R: 5'-CTC TCA TTC CTC CAG TGC AC-3'	58°C	266 pb
2	F: 5'-GGT CTC CTG ATT ATT GTG TGG C-3' R: 5'-GGT TTT AGG GCA GCC TAT G-3'	58°C	256 pb
3	F: 5'-GAT TCT TTG CAT TCT AAG TG-3' R: 5'-TCC TAG AGG CAT TCA TTG TG-3'	54°C	199 pb
4	F: 5'-CTG GGT TTG CTA TGA AGC TG-3' R: 5'-CAC CAT GTG ACA CTA CGC TAT G-3'	60°C	221 pb
5	F: 5'-GAA ACA TTG ACC ACA CTA GCC-3' R: 5'-GGC CAT ATC TTA TTT CCA TA-3'	58°C	279 pb
6	F: 5'-CCA GTA GTT AAA ACT GTG CT-3' R: 5'-CCA AGT TTG GAA CAC AGG CA-3'	58°C	178 pb
7	F: 5'-TCA GTG ACA TAT CAT TAG CC-3' R: 5'-CCA TCA AGC GCA AAT GC-3'	54°C	232 pb
8	F: 5'-TTT GGA CTC CAG GGT CAC AT-3' R: 5'-GAG CAC GTG TGG GAG GAC-3'	58°C	267 pb

2.1.2 Genotipado de ALG2: se realizó el genotipado del exón 2 del gen *ALG2*, para corroborar las variantes génicas observadas por (CES). Se amplificó por PCR y los productos obtenidos se secuenciaron por el método de Sanger. Basándose en la secuencia genómica, se diseñaron cebadores para amplificar el exón2 incluyendo por lo menos 50 pb de las regiones intrónicas flanqueantes (Tabla VI). Se utilizaron condiciones standard de PCR y las condiciones de reacción fueron: 95°C 2 minutos, 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a TM (56°C) seguido de 1 minuto a 72°C. El análisis de secuencias se realizó mediante paquetes informáticos (DNAbaser). La secuenciación de los productos de PCR purificados fue realizada en la unidad Genómica del Instituto de biotecnología C.I.C.V. y A, en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en Buenos Aires, Argentina.

Tabla VI: Secuencia de los cebadores *Forward* (F) *Reverse* (R) utilizados para la amplificación del exon 2 del gen *ALG2*.

Exon	Cebadores	Temperatura de Fusión (T _m)	Tamaño (pb)
2	F:5´ GGATGACCTAGTCCCCAAGG 3´ R:5´ ATAACCACCTGCCACGATCA 3´	56°C	160pb

2.2 Secuenciación masiva de genes o *Next Generation Sequence* (NGS)

La secuenciación masiva en sus diferentes formas metodológicas, permite el análisis de numerosos genes en forma de reacciones simultáneas en un único estudio. Se determinaron variantes génicas mediante secuenciación total del exoma o *Whole Exome Sequencing* (WES) o secuenciación del exoma clínico o *Clinical Exome Sequencing* (CES). Esta metodología es capaz de proporcionar mayor certeza en el diagnóstico, en muy corto tiempo.

2.2.1 Secuenciación completa del exoma (WES)

Los estudios de WES fueron realizados mediante el uso del kit específico de secuenciación exómica *Nimble genexome capturing kit version 2* y la plataforma de secuenciación HiSeq2000 Illumina, con el software CASAVA. Se realizó un análisis profundo de mutaciones y variantes (SNP) en posibles genes causantes de CDG (Matthijs et al., 2013). Los pasos implementados fueron:

- * Preparación de la muestra: Extracción de ADNg mediante el uso de kit comerciales, se evaluó la calidad y concentración requerida para el estudio. Para óptimos resultados se requiere una absorbancia A260/A280 ≥ 1.8 y una concentración de 5 μ M.
- * *Captura del ADNg (DNA Capturing)*: se realizó un enriquecimiento del ADN con la utilización de un array de captación (*DNA-array-in solution capture technology*)
- * *Secuenciamiento (HiSeq2000 Illumina)*: el ADN se fragmenta y se añaden secuencias adaptadoras a los extremos por ligación. A continuación los fragmentos de ADN se amplifican clonalmente y se agrupan (*clustering*) para ser utilizados como entidades a secuenciar. La secuenciación se realiza alternando ciclos de terminación reversible cíclica (*cyclic reversible termination* [CRT]) y ciclos de toma de imágenes (*imaging*). La reacción CRT utiliza terminadores reversibles para incorporar nucleótidos marcados fluorescentemente que a continuación son “fotografiados” en la toma de imágenes y

procesados. Se utilizaron distintos programas bioinformáticos o *softwares* para el análisis de los datos originados en el secuenciamiento:

* Análisis de datos: A partir de los datos generados por *Genome Analyzer Pipeline Software*, CASAVA (*Consensus Assessment of Sequence Variation*), realiza un análisis de datos donde las lecturas o *reads* generados previamente (por el *software Pipeline*) son alineados con un genoma de referencia. Durante el proceso de “construcción”, el *software* CASAVA colecta, filtra y recoge las lecturas alineadas. CASAVA luego llama a la secuencia genómica consenso usando un algoritmo Bayesiano y lo compara con la secuencia de referencia con el fin de identificar variaciones (*SNPs*) homocigotas o heterocigotas. CASAVA genera automáticamente una serie de estadísticas, tales como profundidad media (*depth*) y porcentaje de cobertura de los cromosomas, genes o exones (*coverage*), para permitir la comparación con las construcciones anteriores o de otros individuos

2.2.2 Secuenciación del exoma clínico

La metodología de CES se realizó específicamente, mediante la captura de 4.813 genes anotados en la base de datos de OMIM (genes asociados a enfermedad) incluidos en un panel de genes específicos Illumina® Clinical Exome Sequencing (CES) TruSightTMOne. En total se capturaron 62.000 exones y 50pb de sus regiones intrónicas flanqueantes. Se partió de 50ng de ADNg que se purificó con MagNA Pure Compact, se cuantificó por fluorimetría (PicoGreen), y se comprobó su integridad en un gel de agarosa 1%. El ADN se fragmentó con transposones que a la vez insertan unos adaptadores (tagmentación) y el resultado se analizó en un gel de agarosa 1%. Posteriormente, mediante PCR se unieron otros adaptadores que contienen el índice y unas secuencias complementarias a los oligonucleótidos de amplificación y secuenciación. Los ADNg de los pacientes se mezclaron y se realizó la captura de los fragmentos que contienen las regiones de interés con sondas biotiniladas y bolas magnéticas unidas a estreptavidina. La librería se amplificó y se generaron los *cluster* por PCR en puente. La secuenciación se realizó con un MiSeq o un NextSeq500 en lecturas de 250pb en *paired-end*. Los análisis de calidad de las lecturas, así como el alineamiento y la anotación de variantes se realizaron con el procesador de datos comercial DNA Nexus. El análisis de variantes se realizó en nuestro laboratorio, utilizando la plataforma *Ensembl VEP* (www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index); y como prioridad de búsqueda, se tuvo en cuenta los HPO (*Human Phenotype Ontology*) generados con el programa *The Phenomizer* (<http://compbio.charite.de/phenomizer/>).

2.2.3 Filtrado y análisis de variantes génicas

Para filtrar y priorizar la búsqueda de variantes que debían ser analizadas, se estableció en este trabajo de tesis un protocolo a seguir en función de la implementación de estas metodologías emergentes para el diagnóstico de CDG (**Figura 5**).

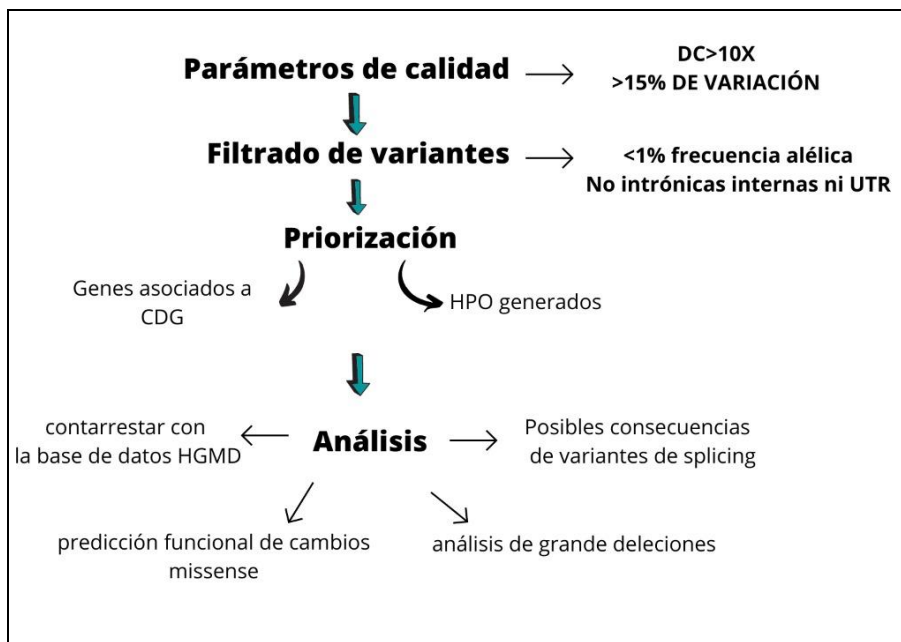


Figura 5. Algoritmo o Protocolo de análisis de variantes.

En primer lugar, se establecieron los parámetros de calidad de las variantes para luego proceder al filtrado de estas utilizando plataformas bioinformáticas y contemplando la frecuencia alélica y su ubicación en el genoma. Posteriormente se priorizaron genes asociados a CDG y la lista de genes candidatos generada con el programa Phenomyzer, y por último se realizó un análisis exhaustivo de las posibles variantes comparándolas con bases de datos poblacionales, analizando patogenicidad y corroborando que estén asociadas a la vía de glicosilación.

Se establecieron parámetros de calidad para determinar las variantes (SNV) suficientemente robustas para continuar con el análisis, descartando aquellas con menos de diez lecturas ($DC < 10x$) y menos de un 15% de variación. Se filtraron los SNV que tuviesen una frecuencia alélica detectada en la población control menor de 1% según las bases de datos 1000g (<https://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers/>), EVS (<https://evs.gs.washington.edu/EVS/>) y ExAc (<http://exac.broadinstitute.org/>). Las variantes localizadas en regiones intrónicas internas y UTR también se excluyeron del análisis.

Para el análisis de filtrado de variantes en todos los casos de secuenciación masiva, se procedió a realizar una “priorización” de las mismas, analizando aquellas localizadas en genes asociados CDG. Si tras este primer análisis de genes, no se encontraron cambios patogénicos, se procede a un segundo análisis priorizando priorización en genes asociados a otras patologías, siendo en primera instancia, los genes asociados a alteraciones secundarias de glicosilación de transferrina o aquellos no asociados a enfermedad pero que forman parte de la vía de formación de glicoconjugados. En particular, en los casos en estudio (AR05, AR06, AR07, AR08 y AR09), se priorizó una lista de 130 genes candidatos implicados no sólo en la ruta de N-glicosilación, sino también involucrados en otras rutas del metabolismo de los carbohidratos, como así también genes codificantes para proteínas implicadas en el tráfico vesicular. Esta lista de genes candidatos, se amplió en cada caso, según el resultado obtenido mediante la utilización de la plataforma Phenomizer (<http://compbio.charite.de/phenomizer/>), que contempla genes candidatos en función de los datos clínicos y bioquímicos introducidos en la misma para cada paciente.

3.0 Determinación de N-glicanos en suero por MALDI-TOF

Para evaluar el perfil de N-glicanos totales en suero se obtuvieron muestras de suero de 3 pacientes ALG-CDG (descritos en el “Capítulo I”) y 3 controles normales. Se utilizaron 10 uL de muestra de suero para desnaturalizar las proteínas séricas con RapiGest™ (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU., en 50 mM de buffer de bicarbonato de amonio, para luego ser, reducidas con ditioneitol (DTT), alquiladas con biiodoactamida (IAA), y deglicosiladas con la enzima PNGasa-F (O/N 37°C), la cual digiere la unión N-acetilglucosamina/ asparragina, liberando la cadena completa de N-glicanos. La muestra obtenida fue luego sometida a purificación por SPE (Hypersep Hypercarb, Thermo Fisher Scientific Inc.) y finalmente permetilada por el método desarrollado originalmente por Ciucanu y Kerek (Ciucanu, I & Kerek, F, 1984). Los espectros de masa de los N-glicanos permetilados, disueltos en metanol, fueron realizados usando 5-cloro-2-mercaptobenzotiazol [CMBT, 10 mg / ml en metanol / agua 80:20 (v / v)] como matriz (Palmigiano et al., 2018).

3.1 Análisis y evaluación de datos MALDI-TOF MS

Los datos de MALDI-TOF MS se adquirieron en polaridad positiva en un analizador proteómico 4800 (AB Sciex) equipado con un láser Nd: YAG que funciona a una longitud de onda de 355 nm con un pulso <500 ps y una velocidad de disparo de 200 Hz. Cada espectro resultó de la suma de aproximadamente 2000 disparos láser. Los espectros de

masas de N-glicanos permitidos se adquirieron en modo reflector permitiendo la detección de masas monoisotópicas. Una calibración externa utilizando un péptido calmix dedicado (AB Sciex), proporcionó una precisión de masa por debajo de 45 ppm (tabla X). Los datos se procesaron utilizando el software Data Explorer TM 4.9.

Las asignaciones estructurales se basaron en identificaciones de peso molecular, conociendo de la ruta biosintética del N-glicano. Las especies de N-glicanos se identificaron mediante el uso de herramientas bioinformáticas, como GlycoMod (<http://web.expasy.org/glycomod/>), Glycoworkbench v2.1 (Ceroni et al., 2008) y mediante herramientas proporcionadas por el consorcio para análisis glicómicos funcionales (CFG; <http://www.functionalglycomics.org>). Los resultados se resumen en la Tabla XI, que informa los datos glicómicos de las corridas por triplicado para cada paciente y tres controles normales de la misma edad. Los archivos sin procesar se cargaron en Glycopost (<https://glycopost.glycosmos.org/>) para su análisis.

3.2 Análisis de N-glicanos de transferrina por MALDI-MS

A partir de 120 uL de suero (provenientes de 3 pacientes ALG2-CDG y 9 controles normales) se purificó la transferrina mediante separación por inmutafinidad en columnas de depleción de transferrina pre-empaquetadas con perlas IgY anti-Tf (Gen Way Biotech, San Diego, CA, EE. UU), siguiendo el protocolo de Sturiale et al, 2008 (Sturiale et al., 2008). La transferrina intacta se analizó en polaridad positiva en un Espectrómetro de masas Voyager STR (Applied Biosystems, MA, EE.UU.), utilizando una solución TFA 0.1% - ACN 1: 2 saturado con ácido sinapínico (Sturiale et al. 2008). Las soluciones de transferrina eluidas se concentraron hasta 100 µl en tampón de bicarbonato de amonio 50 mM. Luego se analizó 1 µl de solución de transferrina intacta por MALDI-MS en modo lineal y polaridad positiva utilizando ácido 5α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), 10 mg / ml en 60/40 (v / v) TFA al 0,1% / ACN, como matriz (1:20 muestra / matriz). No se detectó rastro de proteínas contaminantes. A continuación, la muestra restante se deglicosiló utilizando péptido-N-glicosidasa-F (PNGasa F, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) y se purificó y permitiló siguiendo el mismo protocolo adoptado para el análisis de N-glicanos séricos totales. Las muestras fueron irradiadas con un láser pulsado de 337 nm y los iones formados se aceleraron después de extracción retrasada hasta 24 kV. Se realizó una calibración externa para asignaciones moleculares utilizando un estándar de BSA (Sigma Chemical, MO, EE.UU.).

4.0 Estudios glicómicos y hemostáticos en plaquetas de un paciente PMM2-CDG

4.1 Estudio de agregación plaquetaria en un paciente PMM2-CDG

El estado de agregación plaquetaria se evaluó en un paciente PMM2-CDG en presencia de diferentes agonistas. Estos estudios fueron realizados en el Laboratorio de "La Fundación para el Progreso de la Medicina", en Córdoba, en colaboración con la Dra. Silvia Ghione.

La densidad óptica del PRP se midió a 37° C en un agregómetro Crono-Log (Crono-Log Corp., PA, EE.UU.). Para la calibración del equipo se utilizó el PPP (plasma claro) que se ajustó al 100%, y la transmisión obtenida a través del PRP (plasma turbio u opaco) que se ajustó al 0%v (Hugco Córdoba Pluma et al. 2011; Koltai et al. 2017).

Durante este análisis, la luz pasa a través de la cubeta con el PRP y es capturada por el detector o fotocelda en el lado opuesto (Koltai et al. 2017). Conforme las plaquetas se agregan en respuesta al agonista, el PRP se aclara y transmite mayor cantidad de luz. La transmisión de la luz se mide en tiempo real y se grafica el porcentaje del aclaramiento de la muestra: a mayor agregación plaquetaria, mayor transmisión de la luz y viceversa (Hugco Córdoba Pluma et al., 2011; Koltai et al., 2017;). Se analizaron los siguientes agonistas por separado: ADP 2,5 y 5 μ M, epinefrina 5 μ M (Helena), ácido araquidónico 1mM, colágeno 8 μ g/mL y ristocetina 1,5 mg/mL. Como control se utilizó el PRP de un individuo sano (sin antecedentes previos de sangrado o trombosis) en cada determinación.

4.2 Estudios hemostáticos

Para complementar los estudios de agregación plaquetaria se analizó el estado hemostático del paciente **AR02 (PMM2-CDG)**, se estudiaron diferentes inhibidores de la coagulación: Proteína S (método coagulométrico), Proteína C (método cromogénico), Antitrombina III, como así también los factores de coagulación: III, V, VII, VIII, IX, X y XI. Además, se estudiaron factores protrombóticos, como el anticoagulante lúpico y anticardiolipinas, mediante la técnica de ELISA. Todas estas determinaciones se realizaron con kit comerciales y siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH). Finalmente, a partir de sangre periférica se realizó un estudio citológico de rutina para evaluar todos los elementos formes sanguíneos: recuento de leucocitos, eritrocitos y plaquetas.

4.3 Análisis del perfil de glicanos en membrana plaquetaria por citometría de flujo

El análisis del perfil de glicanos en membrana plaquetaria fue realizado a partir de una alícuota de 50 μL de plaquetas (PRP $2 \times 10^5 \text{ cel/mm}^3$), en muestras pertenecientes a un paciente PMM2-CDG (AR02) y a seis controles normales, (ver obtención de PRP). Posteriormente, se incubaron durante 20 minutos a TA con 50 μL de cada una de las siguientes lectinas biotiniladas: AAL, RCA-I, SNA, WGA, UEA-I, CON-A, PNA, GSL-I, GSL-II y MAA-I (donadas por el Dr. Ivan Martinez Dunker, Centro de Investigación de Dinámica Celular, Laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México), las cuales reconocen diferentes tipos de glicanos (**Tabla VII**) (Li et al., 2018). Finalmente, las muestras se incubaron con estreptavidina acoplada a Alexa-647 (1:1000; Vector Lab) durante 20 minutos a TA posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y Albumina fetal bovina (0,5% p/v) y luego se evaluó la expresión de glicanos unidos a en membrana plaquetaria mediante citometría de flujo en equipo FACS Calibur (Beckton Dickson, EE.UU.). La población de plaquetas se identificó marcando con anticuerpo anti-CD41-PE (BD Biosciences, EE. UU.). Cada determinación se hizo por triplicado. El primer *gate* fue configurado teniendo en cuenta la dispersión de la luz frontal (*Forward scatter*) y lateral (*Side Scatter*) de las plaquetas. El segundo *gate* se estableció en función de la población que expresaba CD-41⁺ (Li et al. 2018). La expresión de lectinas se analizó después de adquirir 10.000 eventos y se informó como Intensidad de Fluorescencia Media (MFI, por sus siglas en inglés) de lectina, descontando la MFI del isotipo (Li et al., 2018). El valor medio de MFI observado en el paciente PMM2-CDG fue evaluado estadísticamente con los valores medios de MFI obtenidos del grupo control para cada lectina. Se aplicó la prueba *t de Student*, $p < 0,05$, para comparar los valores de MFI. Debido al bajo número de pacientes, se calculó un valor F de Fisher modificado, $p < 0,05$, teniendo en cuenta el modelo propuesto por Mycroft *et al.* (2002). Los datos obtenidos en la citometría de flujo fueron analizados con el programa FlowJo® Versión 2.0.

Tabla VII: Lectinas utilizadas y glicano que reconoce cada una.

Lectina	Especificidad	Concentración (µg/ml)
Aleurian Aurantia (AAL)	Fucosa- α 1,6	0,01
Ricinus Communis Agglutinin I (RCA-I)	β -Galactosa	0,02
Sambucus Nigra (SNA)	Acido Siálico -2,6	0,01
Concanavalina A (Con-A)	α -Manosa	0,01
Ulex Europaeus Agglutinin I (UEA-I)	α -Fucosa	0,01
Wheat Germ Agglutinin (WGA)	N-acetilglucosamina y Acido Siálico	0,01
Peanut Agglutinin (PNA)	β -1, N-acetilgalactosamina (Core 1 O- Glicanos)	0,1
Griffonia Simplicifolia Lectin I (GSL-I)	N-Acetilgalactosamina	0,1
Griffonia Simplicifolia Lectin II (GSL-II)	N-acetilglucosamina	0,1
Maackia Amurensis (MAA-I)	Acido Siálico unido a Galactosa α 2,3	0,02

4.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPadv6.01 (GraphPad Software, La Jolla, California, EE.UU., www.graphpad.com). Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM).

RESULTADOS

Capítulo I

“Desórdenes Congénitos de Glicosilación: detección bioquímica e investigación de variantes génicas”

Hipótesis

El amplio espectro clínico de los desórdenes de N-glicosilación manifiesta una gran variabilidad fenotípica y lleva a que estas patologías sean subdiagnosticadas en Argentina y en toda América Latina. La integración de estudios bioquímicos, glicómicos y genómicos permite determinar desórdenes de glicosilación debidos a CDG previamente conocidos o la detección de nuevos genes involucrados a estas patologías.

Identificación de pacientes con alteraciones de N-glicosilación

1.0 Algoritmo bioquímico de estudio de pacientes con sospecha de CDG.

1.1 Cribado clínico de pacientes con sospecha de CDG

Ante la sospecha de una enfermedad metabólica hereditaria, es necesario realizar el estudio de biomarcadores en fluidos biológicos. Respecto a la sospecha de CDG, a partir de las manifestaciones clínicas observadas por el médico especialista derivante, se implementó un algoritmo de trabajo para el estudio de alteración de glicoproteínas propio de nuestro centro (Bistue et al., 2011; Asteggiano et al., 2018) (**Figura 7**).

Fueron incluidas en este trabajo de tesis, 265 muestras biológicas provenientes de pacientes con sospecha clínica de CDG. Los mismos han sido derivados a CEMECO por profesionales médicos de nuestro hospital o provenientes de centros de salud de distintas regiones del país u otros países latinoamericanos.

Las principales manifestaciones clínicas que presentaban los pacientes derivados con sospecha de CDG fueron: hipotonía generalizada (80%); hipoplasia de cerebelo (70%) y síndrome multisistémico de etiología desconocida (90%) (**Figura 6**).

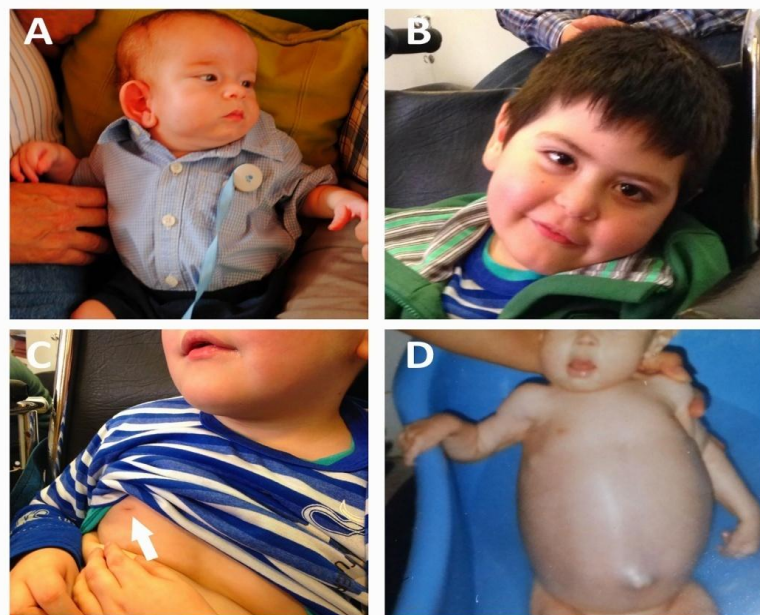


Figura 6. Características clínicas de los pacientes con PMM2-CDG. **A:** Paciente AR01 con fenotipo multisistémico severo; **B y C:** Paciente AR02 con fenotipo neurológico leve. Se puede observar la almohadilla de grasa subcutánea (*fat-pads*) y mamilas invertidas, el estrabismo divergente y la hipotonía generalizada. **D:** Paciente AR03, presentaba marcada disminución en la masa muscular con predominio en las extremidades, lipodistrofia significativa y hepatomegalia (Asteggiano et al., 2018).

A partir de la derivación clínica, se implementó el protocolo para la detección de alteraciones de glicosilación, cuyo algoritmo diagnóstico es complejo, dinámico y de participación multidisciplinaria. Conjuntamente, se innovó en la implementación de nuevas tecnologías, siendo esencial un continuo intercambio entre los profesionales participantes. Una vez definido el perfil de glicosilación de nuestros pacientes mediante dos metodologías diferentes de estudio de glicosilación de isoformas de transferrina, se determinaron 3 grupos de pacientes con sospecha de CDG:

- a)** En los pacientes que resultaron normales, se continuó la comunicación con el médico derivante, ya que hay numerosas clases de CDG que cursan con un perfil normal de transferrina (L.C. Tegtmeier et al 2015; Jaeken 2004; Péanne et al. 2017).
- b)** Pacientes con perfiles tipo de CDG I, el cual incluye la clase de CDG más frecuente (PMM2-CDG) generalmente con una clínica bien definida (estrabismo, mamilas invertidas, hipoplasia cerebelosa, hipotiroidismo, retraso del desarrollo, alteraciones neurológicas y acumulación anormal de tejido graso), se realizó el estudio del gen *PMM2*.

c) Pacientes CDG-I con manifestaciones clínicas no compatibles con PMM2-CDG o pacientes caracterizados CDG-II: se estudiaron por NGS (secuenciación masiva del exoma completo o bien exoma clínico OMIN), para llegar a un diagnóstico preciso, debido a la falta de correlación entre las manifestaciones clínicas específicas y un gen CDG determinado.

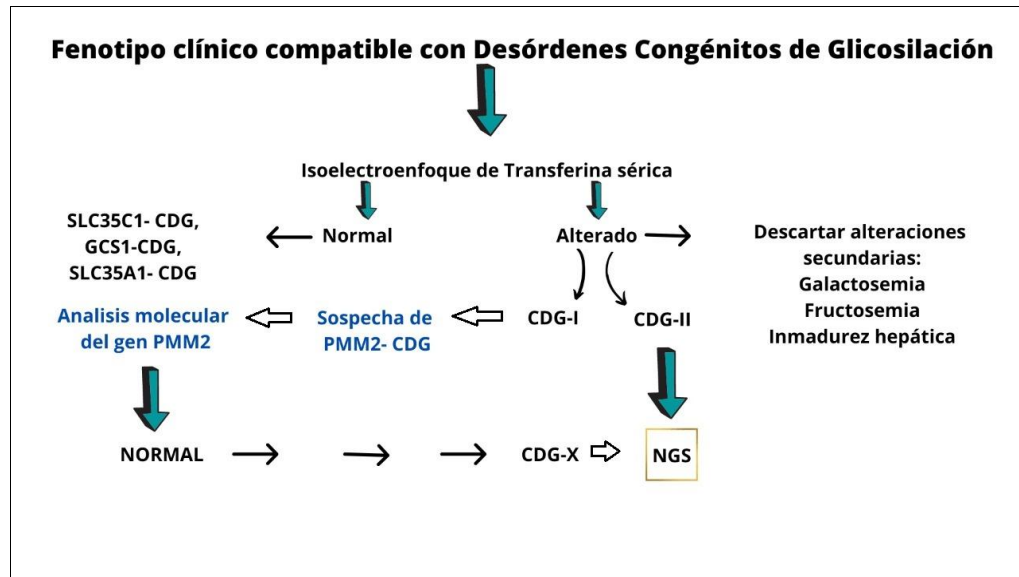


Figura 7. Algoritmo diagnóstico desarrollado para determinación de CDG.

En los siguientes apartados se describen específicamente los resultados observados en cada paso del algoritmo diagnóstico para CDG.

1.2 Screening bioquímico de transferrina sérica

1.2.3 Isoelectroenfoque de Transferrina

En primera instancia, se realizó la determinación del estado de glicosilación de transferrina, mediante la metodología de IEF-Tf (Ver sección Materiales y Métodos). La Tf es analizada en una muestra de suero mediante un estudio cualitativo por IEF-Tf. Los perfiles de isoformas de transferrina sérica analizados por IEF tienen un carácter cualitativo, en ese sentido se caracterizaron perfiles de IEF-Tf Tipo I que presentaron aumento de disialo y asialotransferrina y disminución de tetrasialotransferrina. Los perfiles caracterizados como Tipo II, a diferencia de los anteriores, presentaron aumento de varias isoformas asialiladas al mismo tiempo (asialo, disialo y trisialotransferrina) y disminución de tetrasialotransferrina. De las 265 muestras derivadas para estudio de CDG, se determinaron siete patrones alterados de IEF-Tf Tipo I pertenecientes a los pacientes denominados **ARG04**, **ARG05**,

ARG06, ARG07, ARG08, ARG09 y AR12, y se observaron dos patrones de IEF-Tf Tipo II en los pacientes denominados **ARG10 y ARG11**(Figura 8).

Mediante esta metodología de IEF-Tf también se observaron patrones de migración de Tf alterados, no debidos a CDG, que se denominan en conjunto alteraciones secundarias de la glicosilación de transferrina (Asteggiano et al., 2018; Zühlendorf et al., 2014). Estos patrones alterados de IEF-Tf ya sean de Tipo I o II se observaron en repetidas ocasiones y fueron considerados como falsos positivos. En algunos casos se confirmó que eran debido a hipoglicosilación proteica por alteración hepática o inmadurez hepática en caso de pacientes prematuros. Tres de estos casos requirieron un estudio más profundo, ya que el fenotipo clínico era compatible con CDG, y su estudio se detalla y caracteriza más adelante en el apartado “Alteraciones secundarias de Glicosilación”. En la Figura 8 se observan diferentes patrones de IEF-Tf alterados debido a CDG.

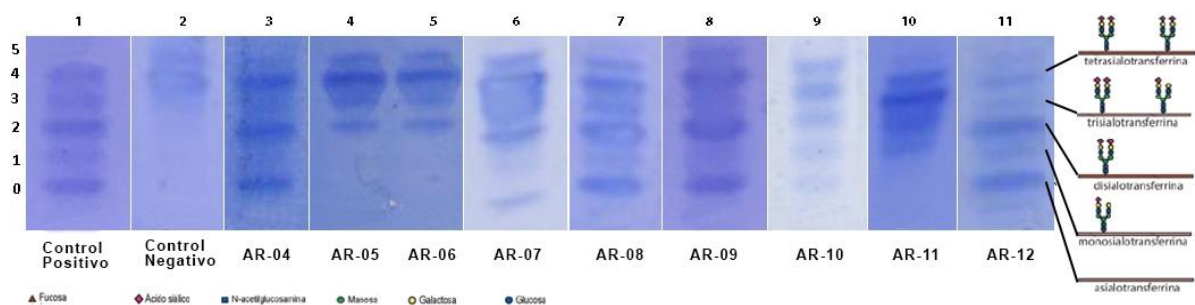


Figura 8. Separación de isoformas de transferrina por IEF. Los ácidos siálicos terminales de la glicoproteína transferrina sérica están indicados a la izquierda como asialotransferrina (0), monosialotransferrina (1), disialotransferrina (2), trisialotransferrina (3), tetrasialotransferrina (4) y pentasialotransferrina (5). Carril 1 control positivo (PMM2-CDG), carril 2 normal. Carriles 3-9 y carril 11 corresponden a patrones de IEF-Tf de tipo I. Los carriles 9 y 10 son patrones de IEF-Tf de Tipo II.

1.2.4 Electroforesis capilar de transferrina

El estudio de isoformas de transferrina mediante electroforesis capilar se ha convertido en los últimos años en una técnica de elección, debido a la posibilidad de obtener resultados cuantitativos de acuerdo a rangos controles observados en patrones normales para cada isoforma. Aquellos pacientes que presentaron perfiles alterados de IEF-Tf (Tipo I o Tipo II) fueron analizados por EC. De esta manera, corroboramos por una metodología cuantitativa las alteraciones observadas en las isoformas de transferrina. En aquellos pacientes que presentaron IEF-Tf Tipo I (**AR04, AR07, AR08, AR09**), en concordancia mediante EC se cuantificó una disminución de tetrasialotransferrina y aumento de la formas disialo y asialo-

Tf (**Tabla VIII**). Los perfiles de transferrina tipo II (**AR10-SB, AR11-SC**), fueron analizados y se cuantificó un aumento de todas las isoformas asialiladas (asialo- disialo- y trisialo-Tf) y una disminución de la isoforma tetrasialo-Tf. A manera de ejemplo se incluyen a continuación los porcentajes obtenidos en la cuantificación correspondientes a cada isoforma en dos pacientes CDG (**AR04 y AR07**) (**tabla VIII**).

Tabla VIII. Cuantificación de los valores de cada isoformas de transferrina sérica cuantificadas por EC en pacientes con IEF-Tf alterado.

Intervalos de Fracciones Isoformas	Valores de referencia	AR04-	AR07
Pentasialo-Tf	11,0 - 19,0%	8,9%	13,1%
Tetrasialo-TF	75,0 - 85,0%	47,7%	68,6%
Trisialo-Tf	2,0 - 5,0 %	4,8%	6,8%
Disialo-Tf	0,5 - 1,4%	38,6%	10.6%
Monosialo-Tf	0,0%	0,0%	0,0%
Asialo-Tf	0,0%	0,0%	0,9%

2.0 Estudios genéticos en pacientes con alteraciones de N-glicosilación

2.1 Análisis Molecular del gen *PMM2* por Secuenciación Sanger

Siguiendo el algoritmo de trabajo propuesto (**Figura 7**) se desarrollaron estudios genéticos moleculares tendientes a detectar alteraciones de genes candidatos para CDG. Se estudió el gen *PMM2*, teniendo en cuenta que el 80% de los pacientes con patrón tipo I pertenecen a este tipo de CDG y basándonos en las características clínicas de los mismos (ver criterios de inclusión). Para ello se amplificó el ADN_g mediante PCR y posteriormente se realizó Secuenciación Sanger para estudiar los 8 exones y regiones flanqueantes del gen *PMM2* (ver materiales y métodos). En el paciente **ARG04** se identificaron variantes patogénicas en el exón 5: c.G488A (p.Arg141His) y en el exón 7: c.G623C (p.Gly208Ala) del gen *PMM2* ya reportadas previamente en la bibliografía (Matthijs G. et al. 1997) (**tabla IX**). También realizamos el estudio de portadores de esos cambios detectados en *PMM2* en los padres del paciente. La madre resultó ser heterocigota para la variante en el exón 7: c.G623C (p.Gly208Ala), mientras que el padre es heterocigota para la variante en el exón 5: c. G488A (p.Arg141His) de dicho gen (**Figura 9**). Los pacientes **AR05 y AR06** son hermanos, ambos

afectos con sospecha de CDG e hijos de padres no consanguíneos sanos. El estudio de IEF-Tf evidenció un patrón CDG Tipo I (**Figura 8**). El genotipado de *PMM2* mostró un resultado negativo no observando variantes patogénicas en este gen. El paciente **AR07**, también resultó normal el estudio del gen *PMM2* por secuenciación Sanger. Por tal motivo siguiendo el algoritmo diferencial para diagnóstico de CDG, se realizaron estudios de secuenciación masiva para la búsqueda de variantes en genes asociados a estas patologías en estos tres pacientes.

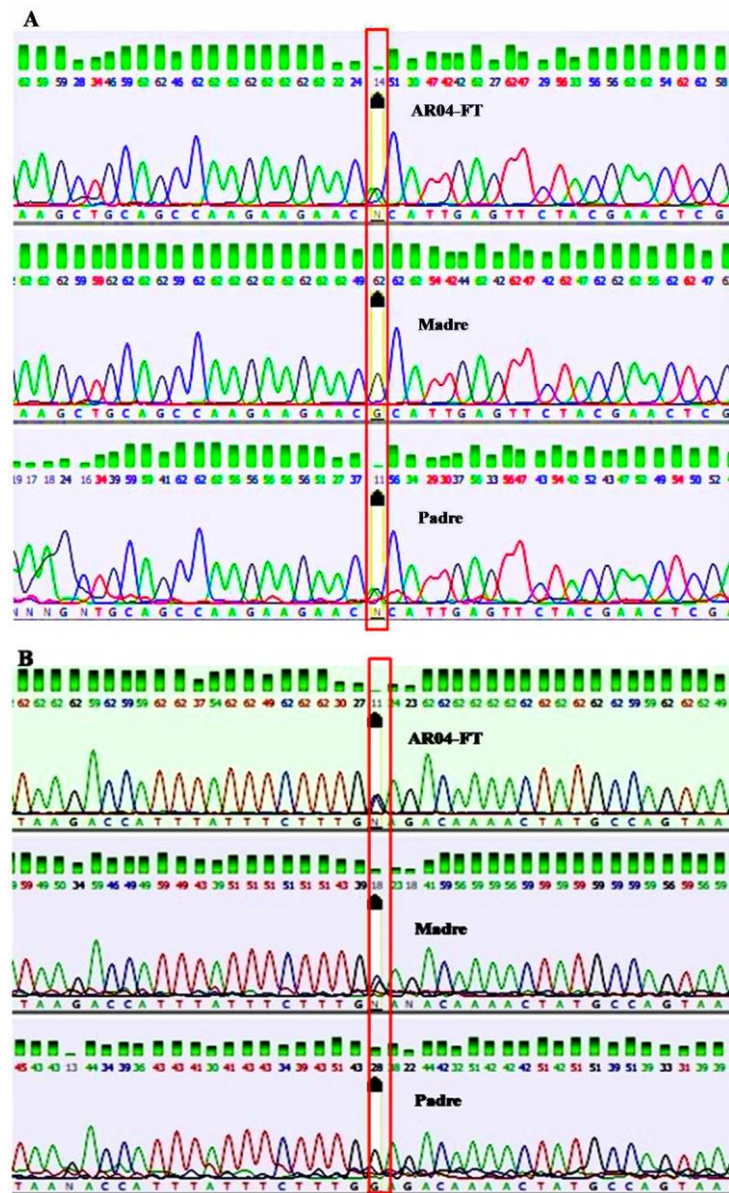


Figura 9. Electroferogramas con variantes encontradas en el gen *PMM2* en el paciente AR04.
A) Electroferogramas de una región del exón 5 donde se puede observar la variante c. G488A (p.Arg141His) en homocigosis en el paciente AR04 y en heterocigosis en el padre. **B)**

Electroferograma de una región del exón 7 donde se manifiesta la variante c.G623C (p.Gly208Ala) en homocigosis en el paciente AR04 mientras que su madre es heterocigota para dicho cambio.

2.2 Estudio de variantes en genes causantes de CDG mediante secuenciación masiva

En este trabajo de tesis se determinaron variantes génicas para CDG por diferentes abordajes de secuenciación masiva que fueron descritas en la sección de materiales y métodos. El paquete informático de datos que se obtuvieron en estos estudios debió ser procesado por un equipo de profesionales bioinformáticos y fueron recibidos y procesados los archivos conteniendo la información específica, ya sea WES y CES para cada paciente en estudio para el filtrado de variantes en genes CDG.

2.2.2 Determinación de variantes génicas en ALG2-CDG

En los pacientes **AR05** y **AR06**, estudiados por WES se utilizó el kit de secuenciación exomica Nimble gen exome capturing kit versión 2 y la plataforma de secuenciación HiSeq2000 Illumina. Se observó en el exón 2 del gen *ALG2* la variante (c.752G>T; p.Arg251Leu) en homocigosis (**tabla IX**) (Asteggiano et al., 2018).

En el caso del paciente AR07, primero estudiamos el gen *PMM2* (como se mencionó anteriormente) y al no observarse variantes patogénicas en este gen, se realizó la secuenciación del exoma clínico (CES). Se identificó la misma variante que en AR05 y AR06, en el exón 2 de *ALG2*, también en homocigosis (c.752G>T; p.Arg251Leu). Esta variante no está incluida en la base de datos HGMD profesional. Se realizó el análisis de patogenicidad con diferentes predictores bioinformáticos: Mutation tester la reporta como "causante de enfermedad" (*score* 0.999), DANN (*score* 0.9955); FATHMM-MKL (*score* 0.8844) y Provean (*score* -3.33) también la reportan como patogénica. Además, el aminoácido que se sustituye es un residuo proteico moderadamente conservado entre especies filogenéticamente alejadas. Esta variante ha sido clasificada como variante de significado clínico incierto (VUS).

2.2.3 Secuenciación Sanger y estudio de portadores para variante en ALG2

El cambio hallado en homocigosis en *ALG2*, se estudió por secuenciación Sanger del exón 2 en los tres pacientes que presentaron esta variante (**AR05, AR06 y AR07**) para corroborar los resultados obtenidos por CES (**Figura 10**).

El estudio genético de los padres para identificar si eran portadores de la variante se realizó también por secuenciación Sanger del exón 2 de *ALG2* en la madre de **AR05** y **AR06** y en

ambos progenitores de **AR07**, resultando heterocigotas simples para la variante (c.752G>T; p.Arg251Leu) (**Figura 10**).

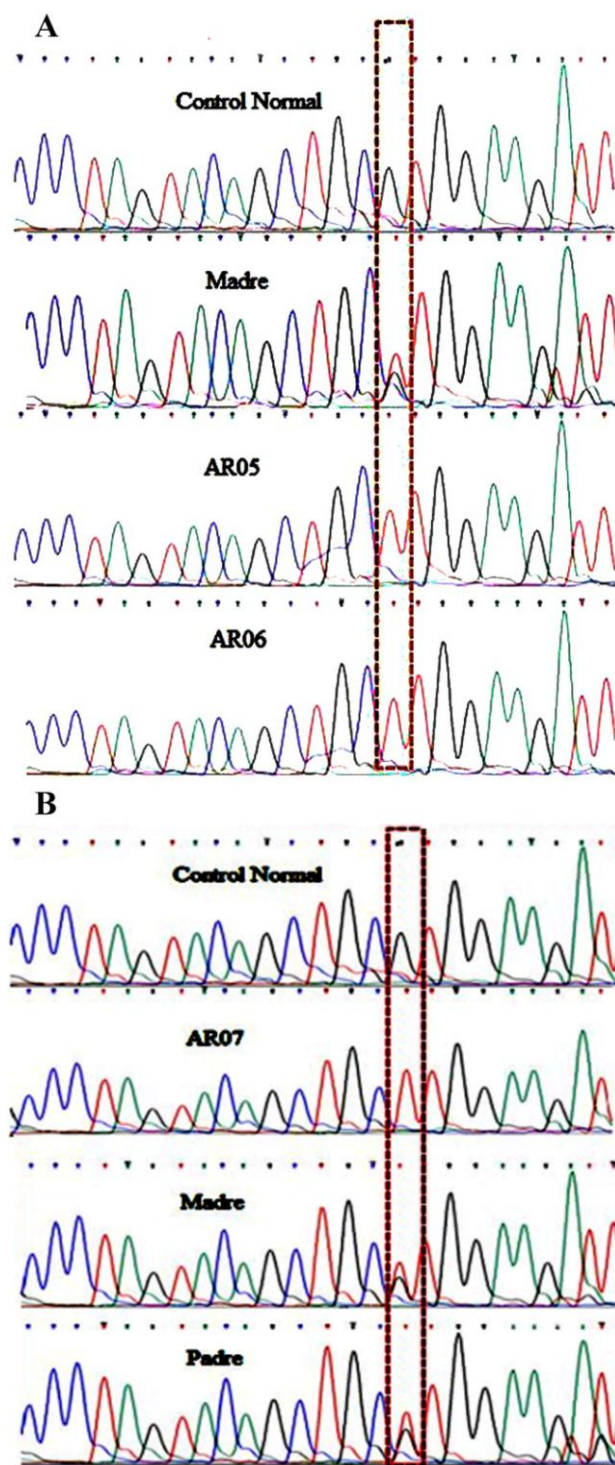


Figura 10. Análisis de portadores de la variante hallada en *ALG2*. **A)** Electroferogramas perteneciente a los pacientes **AR05**, **AR06** y su madre heterocigota para el cambio c.752G>T; p.Arg251Leu. **B)** Electroferogramas paciente **AR07**, madre y padre (ambos portadores de la variante).

2.2.4 Identificación de variantes génicas en *PMM2*

Dos pacientes (**AR08** y **AR09**) han sido identificados como PMM2-CDG mediante la metodología de NGS. El estudio genético del paciente **AR08**, se realizó mediante la secuenciación CES ampliada (amplificación de 6.600 genes incluidos en la base de datos de OMIM) a través de un convenio de colaboración científica con la Dra. Belén Pérez, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” CEDEM, Universidad Autónoma de Madrid, España, donde se realizó la parte experimental. Se realizó el filtrado de variantes génicas a partir de los datos generados utilizando la plataforma bioinformática *VEP de Ensembl* (www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index), estudio realizado en nuestro centro. Se identificaron dos variantes “*missense*” en heterocigosis en el gen *PMM2* (OMIM: 601785), la primera en el exón 5: c.G422A; p.Arg141His y la segunda en el exón 8: c.G691A; p.Val231Met. Ambas variantes ya habían sido reportadas en la bibliografía como patogénicas para PMM2-CDG (Matthijs et al. 2000; Jaeken 1997).

El estudio genético del paciente **ARG09** se realizó mediante la secuenciación del exoma completo (WES) a partir de una muestra de ADNg de sangre periférica mediante la contratación de servicios técnicos especializados para la obtención del archivo VCF (Bitgenia). Los datos bioinformáticos obtenidos fueron analizados en nuestro laboratorio utilizando, en este caso, la plataforma *B-Platform* para el filtrado de variantes (<https://apps2.bitgenia.com/#/home/index>). Se identificaron dos variantes en heterocigosis en el gen *PMM2* (OMIM: 601785). La primera variante: c.484C>T; p.Arg162Trp, produce un cambio C>T en la región codificante del exón 6, produciendo la sustitución del residuo Arginina 162 por Triptófano, uno de los cambios de residuo más significativos dentro del dominio funcional de la proteína resultante (Vega et al., 2011). Este cambio posee muy baja frecuencia poblacional (ausencia de homocigotas en GnomAD) y una predicción patogénica por los algoritmos bioinformáticos: DEOGEN2, EIGEN, FATHMM-MKL, M-CAP, MVP, Mutation Assessor, Mutation Taster, REVEL y SIFT. Se encuentra previamente reportada en ClinVar y Uniprot como patogénica y asociada a Desórdenes Congénito de Glicosilación PMM2-CDG (CDG1A, OMIM: 212065) (Pirard et al., 1999; Vega et al., 2011). Se ha demostrado, mediante estudios funcionales *invitro*, que esta variante produce la disminución de la expresión de la proteína pmm2, la cual mantiene sólo un 32% de su

actividad debido a problemas en la estructura terciaria (inestabilidad) adquirida por la presencia de la variante (Yuste-Checa et al., 2015). La segunda variante detectada en **AR09** se localiza en el exón 3: c.255G>A; p.Gln85= y produce un cambio G>A en la región codificante, produciendo una variante sinónima que mantiene la glutamina 85 en la proteína resultante. La misma posee muy baja frecuencia poblacional (ausente en la base de datos GnomAD) y no se encuentra previamente reportada en bases de datos y/o publicaciones científicas. Sin embargo, es importante destacar que, mediante análisis bioinformático, el *Human Splicing Finder 3.1* predice que esta variante altera el sitio donante de *splicing*, afectando potencialmente la expresión del ARNm (**Figura 11**). Es necesario profundizar en el estudio funcional de esta VUS.

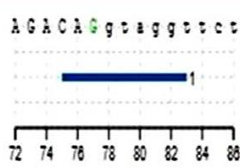
cDNA Position	Interpretation
 <p>AGACAGtaggtctt</p> <p>72 74 76 78 80 82 84 88</p>	<p>Alteration of the WT donor site, most probably affecting splicing</p>

Figura 11. Análisis de predicción de alteración del sitio donante de *splicing*. En la imagen se muestra información obtenida del análisis del cambio c.255G>A (p.Gln85=) utilizando el programa bioinformático Splicing Finder 3.1. La mutación se encuentra en posiciones exónicas tardías, en la figura se muestra los resultados de los sitios de empalme de donantes, ESE y ESS que podrían verse afectados por la mutación.

Se realizó el estudio de portadores de las variantes detectadas en **AR09**, mediante amplificación por PCR y secuenciación Sanger de ambos exones de *PMM2*. En la **Figura 12**, se puede observar el electroferograma del paciente y de sus padres. En el exón 6 se observa en el padre el cambio c.C484T; p.Arg162Trp en heterocigosis; mientras que en el exón 3 se detectó la variante c.G255A; p.Gln85Gln en heterocigosis en la madre del paciente.

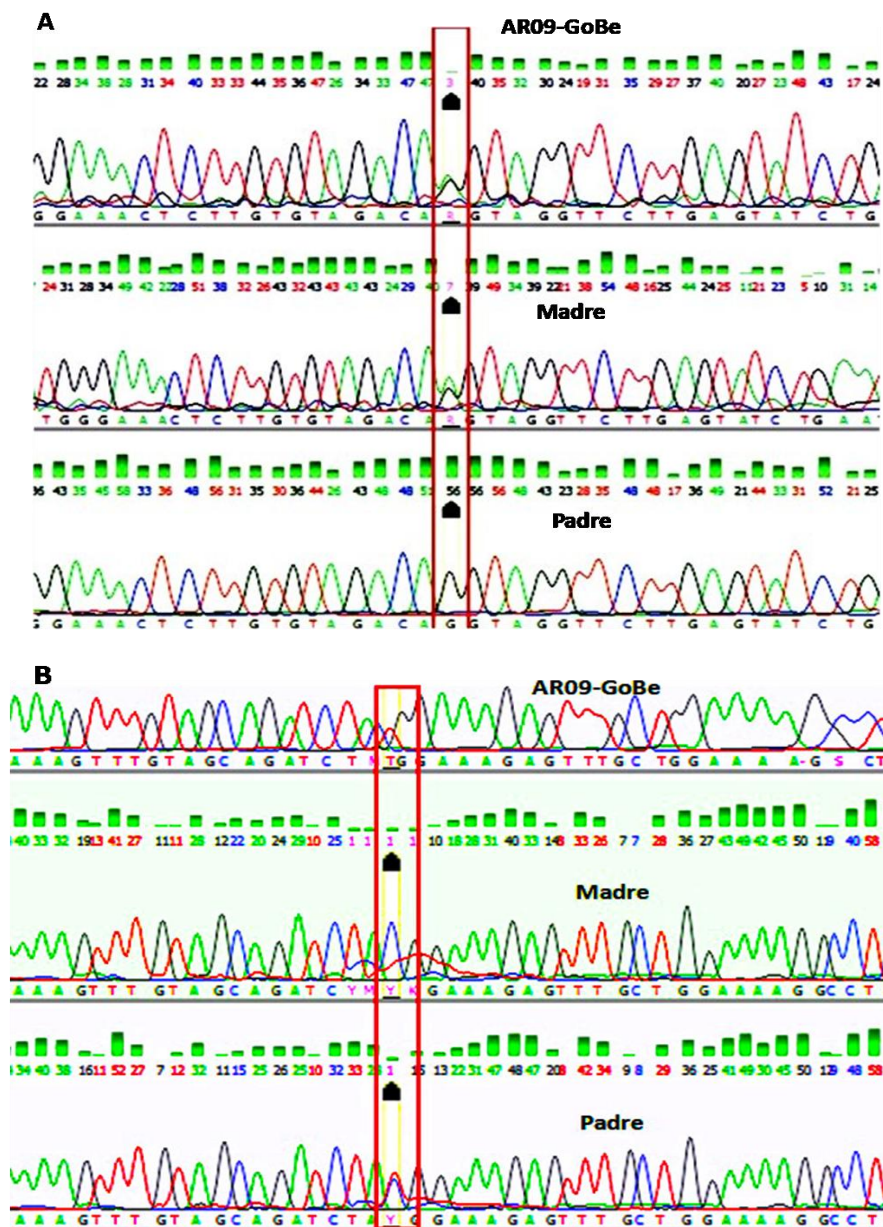


Figura 12. Estudio del gen *PMM2* del paciente AR09. A) Electroferogramas del paciente y sus padres del exón 3 del gen *PMM2* donde se puede evidenciar el cambio c.G255A, p.Gln85Gln siendo la madre portadora del mismo. B) Electroferogramas del paciente y sus padres del exón 6 del gen *PMM2* donde se puede evidenciar el cambio c.C484T (p.Arg162Trp) siendo el padre heterocigota para dicha variante.

2.2.5 Identificación de variantes génicas en *COG1*

El paciente **ARG10** presentó IEF-Tf Tipo II y se realizó el estudio de WES secuenciando en conjunto el ADN_g de sus padres (exoma en trío). Se detectaron mutaciones en el gen *COG1* (OMIM: 606973). La variante encontrada es una duplicación de un nucleótido en homocigosis en el exón 4 de dicho gen: c.2665dupC; p. A889fs (**Tabla IX**). *COG1*-CDG es

una clase de CDG de herencia autosómica recesiva que presenta alteración combinada tanto de N- como de O-glicosilación. Estas variantes han sido confirmadas por secuenciación Sanger tanto en el paciente como en los padres que son heterocigotas para este cambio (Figura 13).

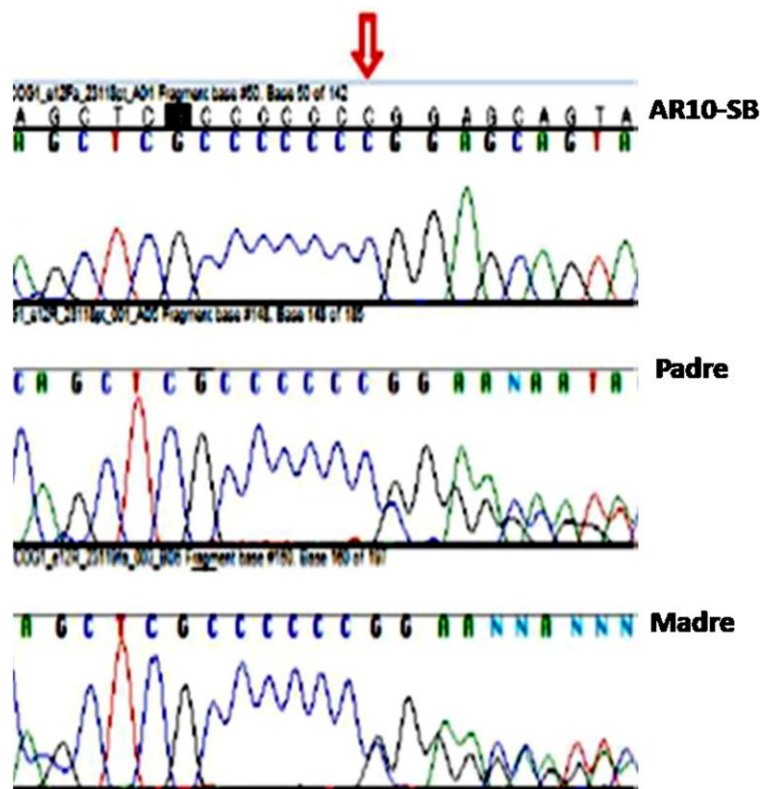


Figura 13. Estudio del gen COG1 en el paciente AR10. Electroferogramas del exón 4 del gen *COG1* del paciente AR10 y sus padres. Se observa la variante c.2665dupC en homocigosis en el paciente, y en heterocigosis en los progenitores.

2.2.6 Estudio genético de AR11 (CDG-IIx)

El paciente **AR11** ingresó a CEMECO, con sospecha de enfermedad metabólica. Presentaba hipotonía, convulsiones, úvula bífida, cuello corto, rigidez de hombros, dismorfia facial, hipoglucemia y anomalía del tallo hipofisario con ectopia pituitaria posterior. El estudio de IEF-Tf, (ver sección 1.2.3 Isoelectroenfoque de Transferrina) resultó alterado, presentando un patrón tipo CDG tipo II. Por este motivo, se decidió estudiar por WES este paciente, ya que además de la alteración de la glicosilación de Tf presentó alteraciones en otras determinaciones metabólicas: aumento de glicosaminoglicanos (GAGs), aumento de biotinidasa y levemente disminuida la enzima N-acetilglucosamina-1-fosforiltransferasa. El criterio de filtrado de variantes en este caso tenía como objetivo buscar mutaciones en genes asociado a CDG tipo II, como así también aquellos genes asociados a mucopolisidosis

(diagnóstico diferencial). También tuvimos en cuenta el estudio del gen *PGM1* en el cual la presencia de úvula bífida suele ser indicativo (L.C. Tegtmeyer et al., 2015), y es un tipo de CDG en el que el IEF-Tf puede ser tipo I, tipo II o incluso normal. Además, la clínica del paciente era compatible con este tipo de CDG.

El filtrado de variantes resultó negativo, es decir no encontramos mutaciones asociadas a mucopolidosis, ni a CDG. Por este motivo, el paciente quedó calificado como CDG-IIx y continúa en estudio.

2.2.7 Identificación de variantes génicas en ALG1-CDG

El paciente **AR12** fue incorporado al estudio de CDG por presentar convulsiones (inicia a los 8 meses de edad), falta de contacto visual e hipotonía desde el nacimiento, retraso del crecimiento progresivo a partir de los 5 meses de edad, retraso madurativo y microcefalia adquirida. Además, presentaba hiperamonemia leve, estudios de coagulación anormales (recuento plaquetario disminuido, tiempo de protrombina disminuido, factor V y VII disminuido), transaminasas hepáticas elevadas (GOT, GPT, GGT), hipoalbuminemia, disminución del colesterol (50-60 mg/ dL). La resonancia magnética cerebral mostró atrofia cortical y central, los potenciales evocados visuales mostraron neuropatía axonal y la electroretinografía tenía una respuesta normal. El IEF-Tf resultó ser Tipo I (**Figura 7, carril 11**), con aumento de disialo y asialo-transferrina. La clínica de AR12 no era compatible con PMM2-CDG, por lo cual se decidió realizar un CES para analizar genes asociados a CDG. Mediante esta metodología se identificaron dos variantes clasificadas como "posiblemente patogénicas" en heterocigosis en el gen *ALG1*: c.826C>T (p.Arg276Trp) y c.863-2A>G.

La variante: c.826C>T (p.Arg276Trp), tiene baja frecuencia en la población (ExAC<0,01%), esta reportada en bibliografía, como causante de ALG1-CDG. La segunda variante, c.863-2A>G compromete el sitio aceptor de splicing, pudiendo provocar una proteína trunca en forma secundaria. No hay reportes bibliográficos de dicha variante.

3.0 Alteraciones secundarias de glicosilación

3.1 Polimorfismos proteicos en la transferrina

Polimorfismos en la N-glicoproteína transferrina (debidos a SNPs en el gen) han sido ampliamente descritos en la bibliografía que ocasionan errores en la interpretación de la

separación de isoformas por varias metodologías entre ellas el IEF, observándose un incremento aparente de trisialotransferrina y/o disialotransferrina y simulando un patrón CDG-I o II (Bode et al., 2008; Zühlsdorf et al., 2014; Asteggiano et al., 2018). Teniendo en cuenta el algoritmo diagnóstico propuesto (**Figura 6**), se estudió de un paciente que al año presentó epilepsia refractaria a la medicación, una severa hipogamaglobulinemia y eventos trombóticos, como principales manifestaciones clínicas conjuntamente con una displasia esquelética. El análisis de Tf por IEF y EC evidenció en el paciente (**Figura 14**) y en uno de sus progenitores (padre) el mismo patrón alterado CDG-II (**Figura 14**). Este hallazgo, sugirió descartar variantes proteicas de la transferrina, polimorfismos que producen cambios en el peso molecular, observándose una migración de las isoformas con aumentos similares al perfil CDG-II (Zühlsdorf et al., 2014). Para confirmar este hallazgo como un polimorfismo proteico, las muestras se digirieron (suero del paciente y de sus padres) con la enzima neuraminidasa, que escinde los ácidos siálicos terminales de la glicoproteína. En caso de no presentar polimorfismo proteico, la migración por IEF de la proteína digerida con neuraminidasa debería ser una sola banda, mientras que se observa más de una banda en presencia de polimorfismos, indicando dos formas de diferente peso molecular de la molécula de transferrina. Tanto en el paciente, como en la muestra perteneciente a su padre, se observó el polimorfismo proteico (**Figura 14**). En la madre no se observó un patrón de migración sugestivo de polimorfismo proteico (**Figura 14**).

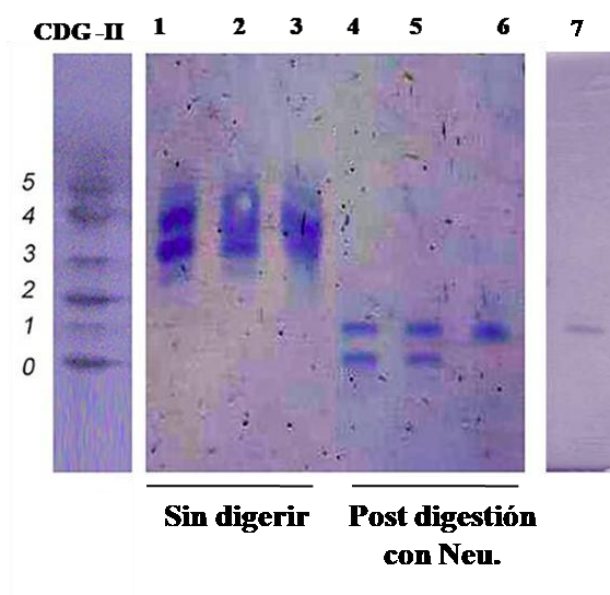


Figura 14. Separación de isoformas de transferrina por IEF. Carril 1: paciente CDG-II. Carril 2: padre. Carril 3: Madre. Los carriles 4, 5 y 6 corresponden a las digestiones con neuraminidasa. Carril

4: Paciente. Carril 5: Padre. Carril 6: Madre. Carril 7: Control Normal digerido con la enzima Neuraminidasa.

3.2 Otras alteraciones secundarias de glicosilación

Durante este trabajo de tesis, se observaron numerosos patrones de migración de IEF-Tf anómalos que fueron descartados luego de profundizar en el algoritmo diagnóstico. No obstante, describimos por primera vez, alteraciones de IEF-Tf compatibles con CDG Tipo I o II debidas a mutaciones en otros genes no relacionados a CDG. A continuación, se describen dos casos estudiados por sospecha de CDG que resultaron ser alteraciones secundarias.

Caso 1

El paciente presentó hipoglucemia grave al nacer, apneas, displasia esquelética progresiva, incluidas deformidades de la mano y macrocefalia. Engrosamiento de articulaciones (especialmente rodillas, muñecas y dedos), sin poder cerrar las manos. También presentó cataratas congénitas que se operaron al año, sin lentes intraoculares. Se observó macrocefalia PC 52 (75-95percentil) con altura al percentil 52. Tuvo un episodio de abdomen globular con hernia umbilical. La radiografía esquelética mostró osteosclerosis y anomalías similares a la osteopetrosis. También se observó nefrocalcinosis e insuficiencia renal crónica, junto con reflujo vesicoureteral grado III. Se observó un patrón de IEF-Tf tipo II y mediante WES, se detectaron mutaciones patogénicas en el gen *COL6A2* que codifica para la proteína subunidad alfa-2 del colágeno VI. El diagnóstico de este paciente fue mioesclerosis autosómica recesiva (OMIM 120240) (Asteggiano et al., 2018).

Caso 2

Paciente derivado para estudios de CDG, presentaba trastornos de aprendizaje y socialización evidentes al ingreso escolar, motivando la consulta con psicología a los 7 años y diagnóstico de Trastorno del Espectro Autista. Al ingreso, a los 10 años de edad presentaba un marcado aumento de peso, con adiposidad proximal en zona genital, y adiposidad en manos y pies sobre falanges. Además, presentaba convulsiones generalizadas inicialmente febriles y en forma aislada no asociadas a aumento de temperatura. En la RMN no se observan alteraciones cerebelosas, pero si una leve hiperintensidad en T2 y Flair periventricular. Se observó un patrón de IEF-Tf tipo I y se estudió su exoma por CES secuenciando 4800 genes reportados en la base de datos OMIM. No se observaron variantes patogénicas asociadas a genes de CDG, pero se detectaron variantes en heterocigosis en el

gen *DYRK1A*, asociadas a retraso mental. En este caso, se catalogó como una alteración secundaria de la glicosilación de transferrina debida probablemente a algún mecanismo desconocido hasta el momento y asociado a esta patología.

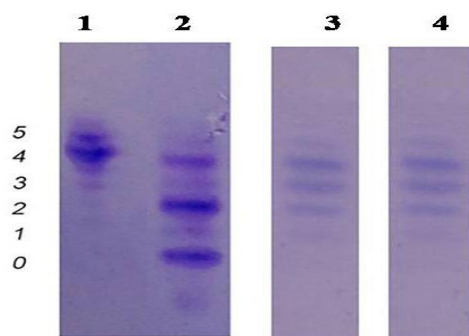


Figura 15. Alteraciones Secundarias de Glicosilación. Carril 1: Control Normal; Carril 2: CDG-I; Carril 3: paciente con mutaciones en *COL6A2*; Carril 4: paciente con mutaciones en *DYRK1A*.

En la Tabla IX se incluyen los pacientes diagnosticados con CDG en nuestro centro durante el desarrollo de esta tesis.

Tabla IX: Pacientes diagnosticados con CDG durante la realización de este trabajo de tesis, período de estudio 2015 – 2019 en CEMECCO.

ARG-CDG	Sexo	FN (FD)	Historia Clínica	Estudios Bioquímicos	Estudios Moleculares	Diagnóstico Genético
ARG04-FT	M	2014	Retraso del desarrollo / hipoplasia cerebelosa e hipotonía. Retraso del crecimiento y trastornos gastrointestinales. Estrabismo	IEF-Tf CE-Tf Patron tipo I	PMM2 Mutaciones Missense exon 5 c. G488A, p.Arg141His (Matthijs et al., 1997) exon 7 c.G623C; p.Gly208Ala (Asteggiano et al., 2018)	Sec. Sanger PMM2-CDG
ARG05-LA	F	2010	Epilepsia refractaria, retraso del desarrollo, dismorfia facial, reflejos tendinosos débiles y espasmos en flexión. Atrofia frontotemporal, microcefalia y rasgos faciales dismórficos con fisuras de palpebral descendentes. Se observaron arritmias, colobomas bilaterales del iris, cataratas unilaterales y factores de coagulación anormales.	IEF-Tf CE-Tf CDG-I	ALG-2 Mutaciones Missense (Homocigota) exón 2 c.752G>T, p.Arg251Leu (Asteggiano et al., 2018)	Sec. Masiva WES ALG2-CDG
ARG06-LJ	M	2008	Epilepsia refractaria, retraso del desarrollo, dismorfia facial, reflejos tendinosos débiles y espasmos en flexión. Atrofia frontotemporal, microcefalia y rasgos faciales dismórficos con fisuras de palpebral descendentes. Se observaron arritmias, colobomas bilaterales del iris, cataratas unilaterales y factores de coagulación anormales	IEF-Tf HPLC-Tf CDG-I	ALG-2 Mutaciones Missense (Homocigota) exón 2 c.752G>T, p.Arg251Leu (Asteggiano et al., 2018)	Sec. Masiva WES ALG2-CDG
ARG07-ME	M	2018	Epilepsia, convulsiones, retraso del desarrollo	IEF-Tf HPLC-Tf CDG-I	ALG-2 Mutaciones Missense (Homocigota) exón 1: c.752G>T,p.Arg251Leu (Asteggiano et al.,	Sec. Masiva TES ALG2-CDG

					2018)	
ARG08-CO	M	2019 (†2019)	Convulsiones, Hipoplasia cerebelosa, alteraciones de la coagulación	IEF-Tf CDG-I	PMM2 Mutaciones Missense exón 5 c. G488A, p.Arg141His (Matthijs et al., 1997) exón 8 c.G756A, p.Val231Met (Vuillaumier-Barrot et al., 2000)	Sec. Masiva WES PMM2- CDG
ARG09-GB	M	2019	Movimientos oculares alterados, ptosis palpebral, retraso del crecimiento, hipotonía	IEF Tipo I	PMM2 Mutaciones Missense exón 3 c.G255A p.Gln85Gln (NR) exón 6 c.C484T p.Arg162Trp (Pirard et al., 1999)	Sec. Masiva WES PMM2- CDG
ARG10-SB	M	2019	Convulsiones, retraso general del desarrollo, Hipotonía severa, problemas deglutorios, hipoplasia del cuerpo calloso. Infecciones a repetición.	IEF-Tf Tipo II	COG1 Mutación en homocigosis exón 4 c.2665dupC:p. A889fs	Sec. Masiva WES COG 1- CDG
AR11-CS	F	2017	Hipotonía, convulsiones, úvula bífida, cuello corto, rigidez de hombros, dismorfia facial, Hipoglucemia. Anomalía del tallo hipofisario con ectopia pituitaria posterior	IEF-Tf Tipo II	CDG-IIx	
ARG12-RB	M	2018	Convulsiones refractarias, falta de contacto visual, retraso del crecimiento, retraso en el desarrollo y microcefalia adquirida.	IEF-Tf Tipo I	ALG1 c.826C826T p.Arg276Trp c.A863-2G	ALG1- CDG

4.0 Validación de la variante génica detectada en pacientes ALG2-CDG

Respecto a la variante génica de significado incierto c.752G>T, p.Arg251Leu (VUS) descrita en tres pacientes ALG2-CDG (**ARG05, ARG06 Y ARG07**), no está incluida en la base de datos HGMD profesional aunque la misma refiere predicción patogénica por diferentes algoritmos bioinformáticos, siendo un residuo proteico moderadamente conservado entre especies filogenéticamente alejadas, es importante realizar un estudio poblacional para su validación.

4.0.1 Estudio poblacional de la VUS descrita para *ALG2*

Muestras de ADN_g proveniente de sujetos controles, sin patologías evidentes, fueron anonimizadas para ser incluidas en ese estudio, ya sea provenientes de la población autóctona donde fueron detectados los 3 pacientes con ALG2-CDG (Provincia de Mendoza, Argentina) y muestras foráneas de la población Argentina (100 individuos, 200 alelos). Se secuenció el exón 2 del gen *ALG2*, según lo establecido por la *Human Genom Variation Society* (HGVS) (<https://www.hgvs.org/>) para determinar la frecuencia que presenta esta variante en la población. Si la variante se encuentra en un porcentaje mayor al 1% de la población estudiada no se puede considerar que la variante sea patogénica. En el caso de los controles estudiados no se detectó la variante c.752G>T, p.Arg251Leu.

Discusión

Las principales manifestaciones fenotípicas observadas en los pacientes diagnosticados con CDG (n: 9) hacen referencia a un fenotipo severo de la enfermedad, predominando en el 100% de ellos la afectación neurológica. El 100% además presentó retraso psicomotor e hipotonía generalizada. En 2 pacientes (22,2%) se observó hipoplasia cerebelosa y mamilas invertidas (**AR04**, **AR08**). Convulsiones ya sean refractarias a la medicación o no, fueron comunicadas en 44,4% de los pacientes (**AR07**, **AR08**, **AR09**, **AR10**). Los 3 pacientes caracterizados con ALG2-CDG (100%) presentaron epilepsia refractaria al tratamiento (**AR05**, **AR06** Y **AR07**). Tres pacientes (33,3%) presentaron alteraciones de la coagulación (**AR05**, **AR06** y **AR08**). Dentro de las alteraciones oculares observamos, en (11,1%) estrabismo (**AR04**), en 22,2% colobomas bilaterales del iris y cataratas unilaterales (**AR05**-, **AR06**), movimientos oculares alterados y ptosis palpebral fueron observadas en un 11,1% (**AR09**). Dos pacientes (22,2%) presentaron dismorfias faciales (**AR05**, **AR06**). Solo un paciente (11,1%) presentó alteraciones gastrointestinales (**AR04**). Con relación a los problemas cardíacos descritos para CDG, los pacientes incluidos en este estudio no presentaron problemas cardíacos severos, sólo se registran arritmias en 22,2% de los pacientes (**AR05** y **AR06**).

En el transcurso de esta tesis se diagnosticaron tres pacientes PMM2-CDG, el tipo de CDG más frecuente, con una incidencia mundial de 1:20000 (Altassan et al. 2019). El paciente **AR04**, fue el único de los tres que presentó el fenotipo clínico típico de este tipo de CDG, por lo cual su diagnóstico se realizó secuenciando los 8 exones del gen *PMM2*. El mismo resultó heterocigota compuesto, presentando la mutación más frecuente en *PMM2*, la pArg141His (c.G488A) en el exón 5, de origen ancestral europeo. Esta mutación nunca fue hallada en homocigosis debido probablemente a que en ese estado es letal. Además se detectó una variante en el exón 7: c.G623C; p.Gly208Ala que no había sido reportada hasta el momento (Asteggiano et al., 2018). En el paciente **AR08**, se recurrió a la secuenciación masiva de genes (CES), debido a que los datos clínicos eran escasos y sólo se contaba con sangre impregnada en papel de filtro para la extracción de ADNg. Se llegó exitosamente al diagnóstico molecular siguiendo el protocolo de filtrado e variantes propuesto por nuestro grupo de trabajo (**Figura 6**) identificando dos variantes en heterocigosis en *PMM2*: en exón 5 c.G488A, p.Arg141His y en exón 8 c.G756A, p.Val231Met. En **AR09** los datos clínicos tampoco eran sugestivos de PMM2-CDG, razón por la cual no se realizó la secuenciación

Sanger del gen *PMM2* en primera instancia, y la elección fue utilizar NGS como herramienta de diagnóstico molecular. Se identificaron dos variantes *missense* en heterocigosis en dicho gen: exón 3 c.G255A p.Gln85Gln (NR) exón 6 c.C484T p.Arg162Trp. La variante encontrada en el exón 3 (VUS), mediante predictores bioinformáticos se puede comprobar que afectaría el sitio donante de *splicing*, afectando de esta manera a la proteína. A futuro sería de gran importancia desarrollar estudios funcionales, para poder validar *in vitro* el efecto patogénico de la misma.

Teniendo en cuenta los tres pacientes con mutaciones en *PMM2*, podemos destacar la importancia que tiene disponer de los datos clínicos completos de los pacientes durante el proceso de diagnóstico para que el mismo sea exitoso, ya que esto contribuye a definir el algoritmo a desarrollar, como así también, en el caso que se implemente NGS, facilita el filtrado de variantes (Francisco et al., 2019; Asteggiano et al., 2018).

Los tres pacientes ALG2-CDG presentados son los primeros casos de este tipo de CDG identificados en nuestro país, existiendo hasta el momento solo nueve casos a nivel mundial. Conjuntamente, reportamos por primera vez esta mutación en el gen *ALG2*. Los pacientes **AR05** y **AR06**, son hermanos y ambos presentaron un patrón de IEF-Tf tipo I y manifestaciones clínicas muy similares. Mediante WES se logró identificar una variante en homocigosis en el exón 2 del gen *ALG2*: c.752G>T, p.Arg251Leu. La misma variante fue identificada en el paciente AR07, que también presentó IEF-Tf tipo I y manifestó una clínica muy similar a **AR05** y **AR06**. Esta VUS es un dominio filogenéticamente conservado entre especies y presenta una frecuencia poblacional baja. También se analizó con diferentes predictores bioinformáticos que la misma se califica como patogénica. El análisis *in silico* indicaría, que la nueva variante hallada por nuestro grupo de trabajo, sería causante de ALG2-CDG. El estudio poblacional, permitió validarla y demostrar que este cambio no está presente en la población general, mediante la secuenciación del exón 2 de *ALG2* en 200 alelos de controles sanos. En concordancia con nuestros resultados, esta variante no fue encontrada en grandes proyectos de secuenciación como son GENOMAD o 1000G. De esta manera, según lo recomendado por la HGMD, podemos afirmar que la variante c.752G>T, p.Arg251Leu no corresponde a un polimorfismo local debido a que su frecuencia en la población es < al 1%.

Otros hallazgos durante este trabajo de tesis implementando NGS a nuestro algoritmo, fueron la detección de un paciente COG1-CDG (**AR10**), y otro ALG1-CDG (**AR12**).

En el paciente **AR11**, no logramos llegar a un diagnóstico molecular. La sospecha clínica estaba asociada a PIGM1-CDG, pero la búsqueda de variantes en este gen y todos los asociados a CDG resultó negativa, continuando este paciente en estudio. Es importante considerar que mediante esta metodología de secuenciación masiva podemos evidenciar variantes en la región exónica, pero si presenta variantes intrónicas, no las estaríamos detectando. Por tal motivo no podemos descartar que la falta de hallazgos genéticos por WES indique que no se podría corresponder a un paciente CDG, para salvar estas posibles dificultades lo conveniente sería repetir la secuenciación masiva pero mediante el estudio del genoma total del paciente.

Por otra parte, la identificación de variantes génicas en pacientes con IEF-Tf alterado que no correspondieron a CDG, contribuyen al conocimiento de las alteraciones secundarias de la glicosilación y a la mejora del algoritmo en el diagnóstico de dicha patología.

Por todo esto podemos destacar que la implementación de la tecnología NGS, en combinación con determinaciones bioquímicas es de suma importancia para el avance y caracterización de nuevos tipos CDG, como así también para la identificación de alteraciones secundarias de la glicosilación, sentando un precedente en nuestro país en la determinación genética de estas patologías metabólicas hereditarias.

CAPITULO II

“Caracterización glicómica de pacientes CDG”

Hipótesis

El avance de las tecnologías de secuenciación masiva trajo aparejado la identificación de nuevos genes o variantes génicas asociados a CDG (Péanne et al., 2017; Ng & Freeze 2018). La implementación de protocolos combinados glicómicos y genómicos, ya sea para la caracterización de nuevos tipos de CDG o para validar indirectamente nuevas variantes génicas, resultan técnicas de alta sensibilidad útiles para la determinación diferencial de CDG tipo I y II y la caracterización de los diferentes glicofenotipos asociados que contribuyen al diagnóstico preciso.

1.0 Estudios glicómicos en pacientes ALG2-CDG

En este capítulo de la tesis, se profundizó en la caracterización glicómica de pacientes CDG diagnosticados en nuestro centro. En primer lugar, se estudió el perfil de glicanos en suero y unidos a Tf por Espectroscopia de Masas (EM), en tres pacientes ALG2-CDG (descritos en el **Capítulo I**). Siendo escaso el número de pacientes reportados para esta clase de CDG, a nivel mundial solo se han reportado 9 pacientes con este tipo de CDG-I (Thiel et al., 2003; Cossins et al., 2013), de los cuales 3 han sido identificados por nuestro grupo de trabajo (**AR05, AR06 y AR07**) (Asteggiano et al., 2018). Los mismos presentan una VUS en homocigosis en el gen *ALG2*, razón por la cual es fundamental profundizar en su estudio para inferir el grado de patogenicidad que podría estar asociado a la dicha variante. La caracterización del perfil de N-glicanos en suero y unidos a Tf, permite describir en términos glicómicos, los cambios estructurales en este tipo de CDG, a la vez que confirma una alteración en la vía de N-glicosilación, y valida indirectamente el cambio encontrado a nivel genético por NGS. Los resultados glicómicos se detallan a continuación.

1.1 Análisis MALDI-MS de transferrina sérica intacta

Se purificó la proteína Tf intacta por inmunoafinidad en muestras de suero de los 3 pacientes ALG2-CDG (**AR05, AR06, AR07**) y 3 controles normales, analizando por MALDI-MS el estado de glicosilación de sus isoformas. Los perfiles observados, indican una baja ocupación de los sitios de N-glicosilación (**Figura 16**). Estos resultados se corresponden con el estudio de IEF-Tf, corroborando un defecto CDG tipo I. La isoforma di-glicosilada (tetra-sialotransferrina) es la forma dominante en suero (Tf-2gly) en controles normales. En todos los pacientes CDG, se observó la presencia de formas mono-glicosiladas (Tf-1gly),

correspondientes a disialo-transferrina, formas no presentes en el control (**Figura 16A-D**). Además, en las muestras correspondientes a pacientes CDG se observó un aumento de asialo-transferrina monoglicosilada (Tf-0 gly) (**Figura16**).

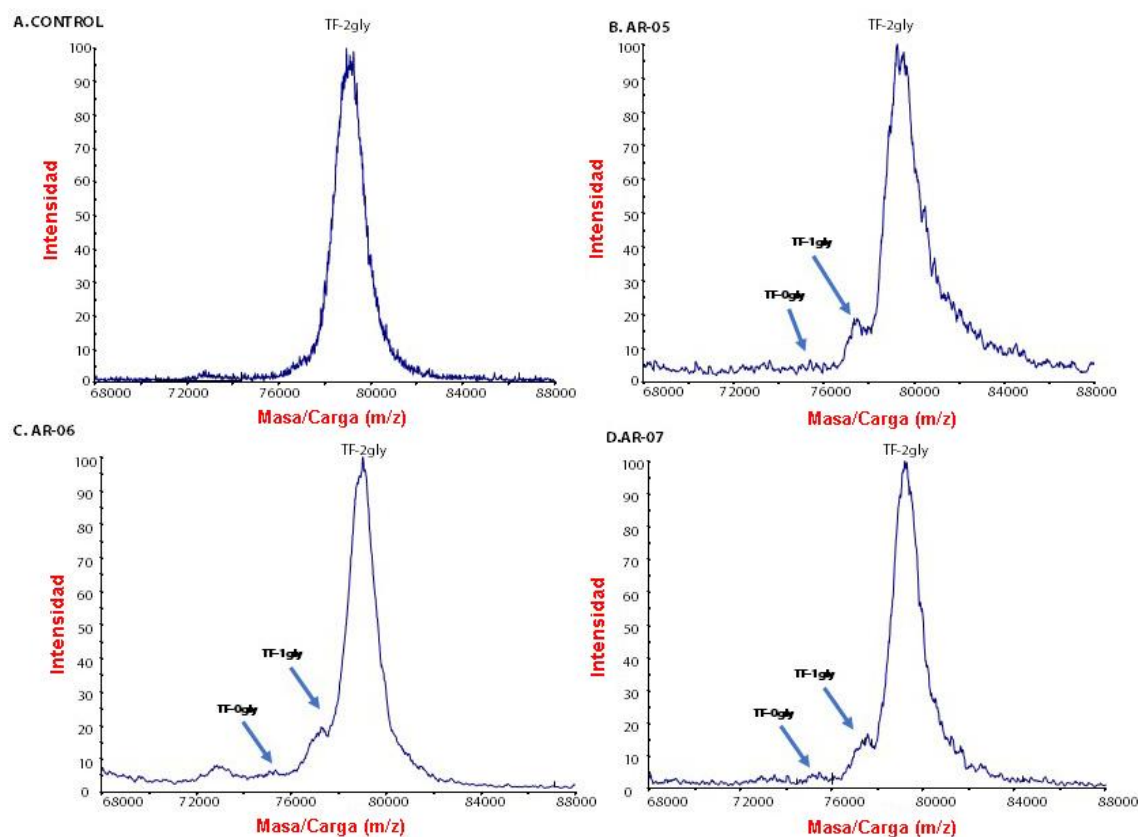


Figura 16. Espectros de masa MALDI de transferrina sérica intacta: (A) Control Normal; (B) paciente AR05; (C) paciente con AR06; (D) paciente AR07.

1.2 Análisis MALDI-MS de N-glicanos totales de transferrina

También se analizaron los N-glicanos escindidos de Tf en los tres pacientes para describir cualitativamente el defecto de ensamblaje (CDG-I) y posibles cambios de glicosilación debidos al procesamiento alterado de N-glicanos. En comparación con el control, los pacientes con ALG2-CDG mostraron un aumento de los N-glicanos hiposialilados, junto con un aumento general de la fucosilación (**Figura. 17, 18, y 19 y Tabla X**). En el rango de masa baja, se detectaron en pequeñas cantidades, una plétora de N-glicanos inmaduros y procesados de manera defectuosa, tales como especies con alto contenido de manosa, híbridas e hipogalactosiladas (**Figuras 17B, 18C Y 19 B**). Por tanto, el análisis global indicó que en los perfiles de los tres pacientes estaban presentes diversos grados de alteraciones de

N-glicanos de Tf, observando mayor afectación en los pacientes AR05 y AR06, que el paciente AR07.

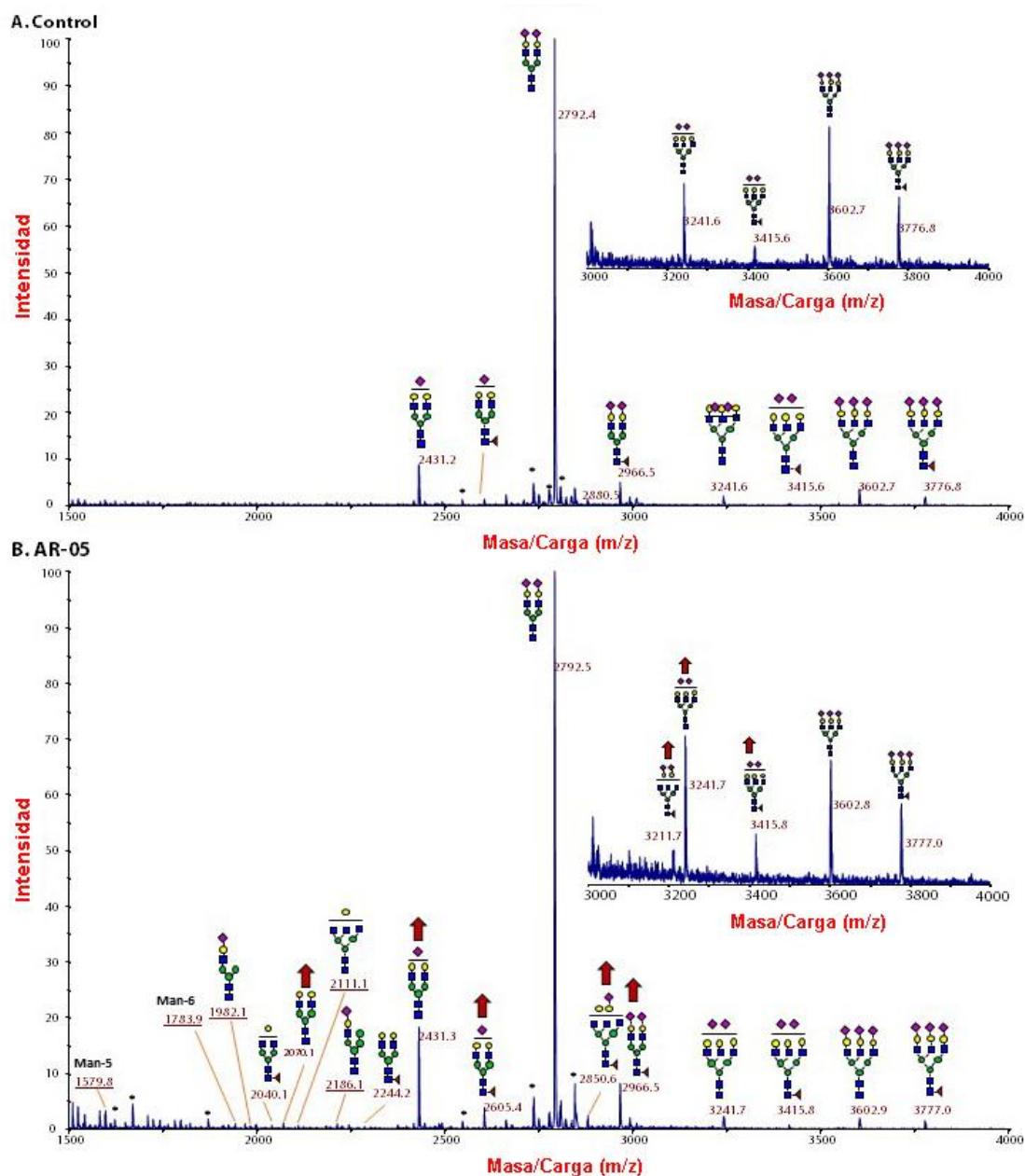


Figura 17. Análisis MALDI-MS de N-glicanos permetilados de transferrina sérica en el paciente AR05. (A) Rango de masa alto y bajo del control y (B) rango de masa alto y bajo del paciente AR05. Los aumentos importantes de N-glicanos, indicados en (A) y (B) con flechas rojas y masas moleculares subrayadas (estas últimas se refieren a N-glicanos no presentes en el control), involucran especies monosialo-biantenarias, disialo-triantenarias y / o-fucosiladas. Símbolos de

glicanos: GlcNAc, cuadrado azul; Man, círculo verde; Gal, círculo amarillo; NeuAc, cuadrado morado; asteriscos, contaminantes

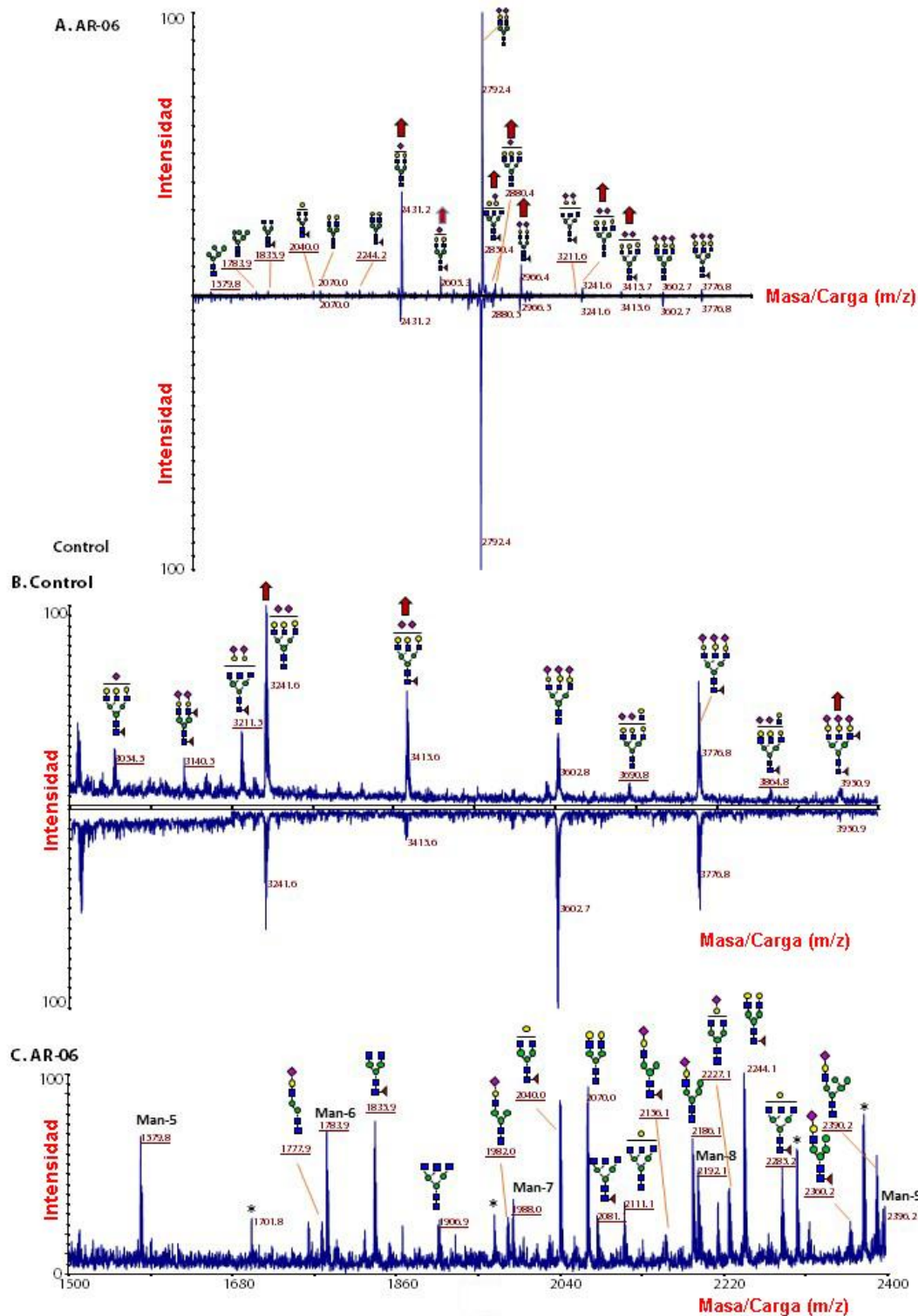


Figura 18. Análisis MALDI-MS de N-glicanos permetilados de transferrina sérica en el paciente con AR06. (A) Rango de masa completo y (B) rango de masa alto en comparación con el

control, y (C) rango de masa bajo de AR06. Los aumentos importantes de N-glicano, indicados en (A) y (B) con flechas rojas y masas moleculares subrayadas (estas últimas se refieren a N-glicanos no presentes en el control), involucran especies monosialo-biantenarias, disialo-triantenarias y / o-fucosiladas. Símbolos de glicanos: GlcNAc, cuadrado azul; Man, círculo verde; Gal, círculo amarillo; NeuAc, cuadrado morado; asteriscos, contaminantes

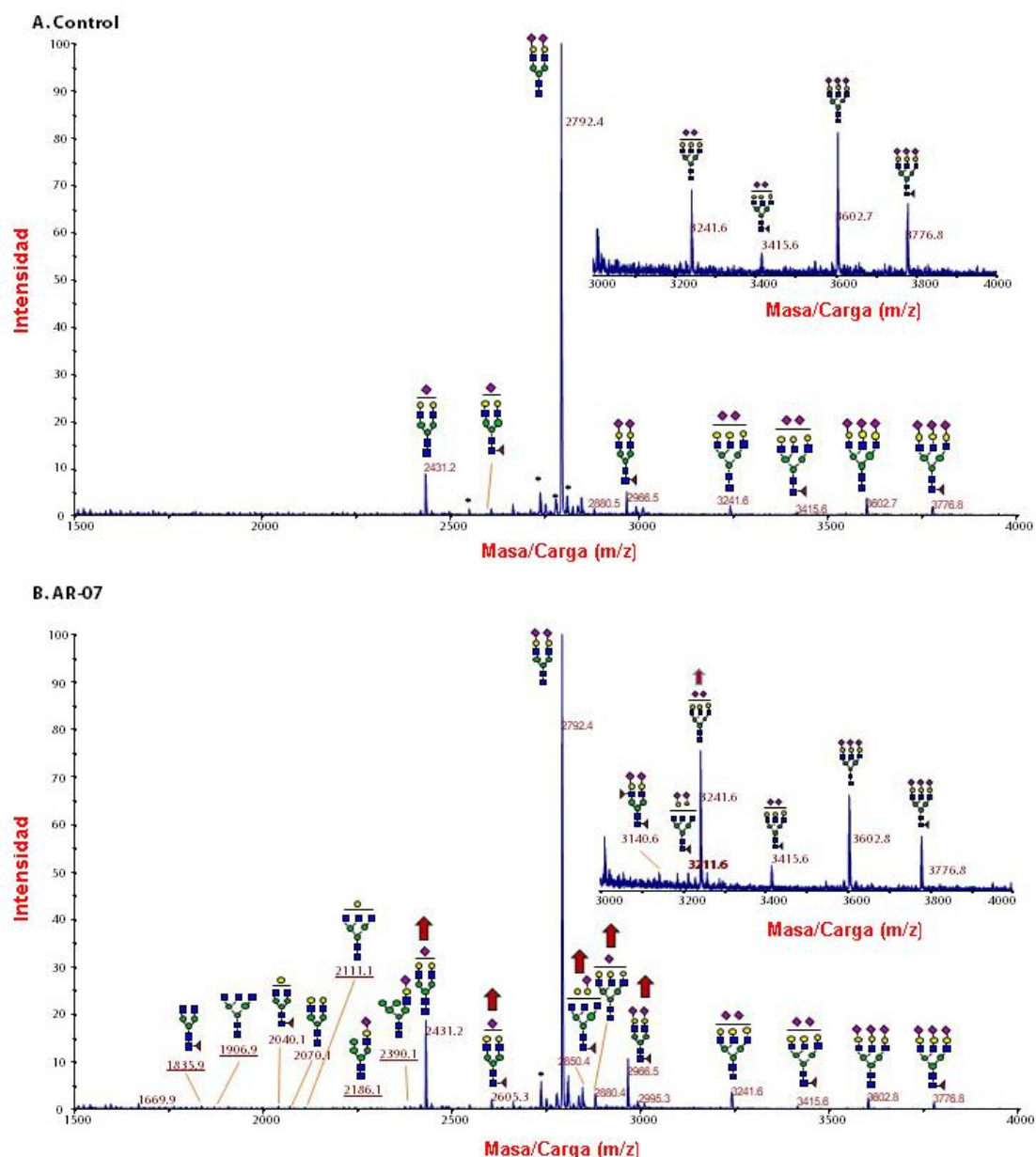


Figura 19. Análisis MALDI-MS de N-glicanos permetilados de transferrina sérica en el paciente con AR07. (A) Rango de masa alto y bajo del control y (B) rango de masa alto y bajo del paciente AR07. Los aumentos importantes de N-glicanos, indicados en (A) y (B) con flechas rojas y masas moleculares subrayadas (estas últimas se refieren a N-glicanos no presentes en el control), involucran especies monosialo-biantenarias, disialo-triantenarias y / o-fucosiladas. Símbolos de

glicanos: GlcNAc, cuadrado azul; Man, círculo verde; Gal, círculo amarillo; NeuAc, cuadrado morado; asteriscos, contaminantes.

1.3 Análisis MALDI-MS de N-glicanos totales en suero

El resultado observado en el análisis de las glicoproteínas séricas totales de los pacientes CDG mediante MALDI-TOF reflejó las mismas alteraciones de N-glicanos observadas en la Tf sérica. Además de un aumento general de la fucosilación, los espectros de los pacientes con ALG2-CDG mostraron a una masa molecular baja (m/z 1500-2430) (**Figura 20**) y en un rango de masa más alto (entre m/z 3000 y 4500) (**Figura 21**) y mayores cantidades de especies hiposialiladas. También, en relación con el control, los pacientes AR05 y AR06 presentaron un aumento significativo en N-glicanos ricos en manosa e híbridos (**Figura 20 B y C**), así como en estructuras hipogalactosiladas (**Figura. 20 B y C**). Los resultados del estudio glicómico se resumen en la **Tabla X**.

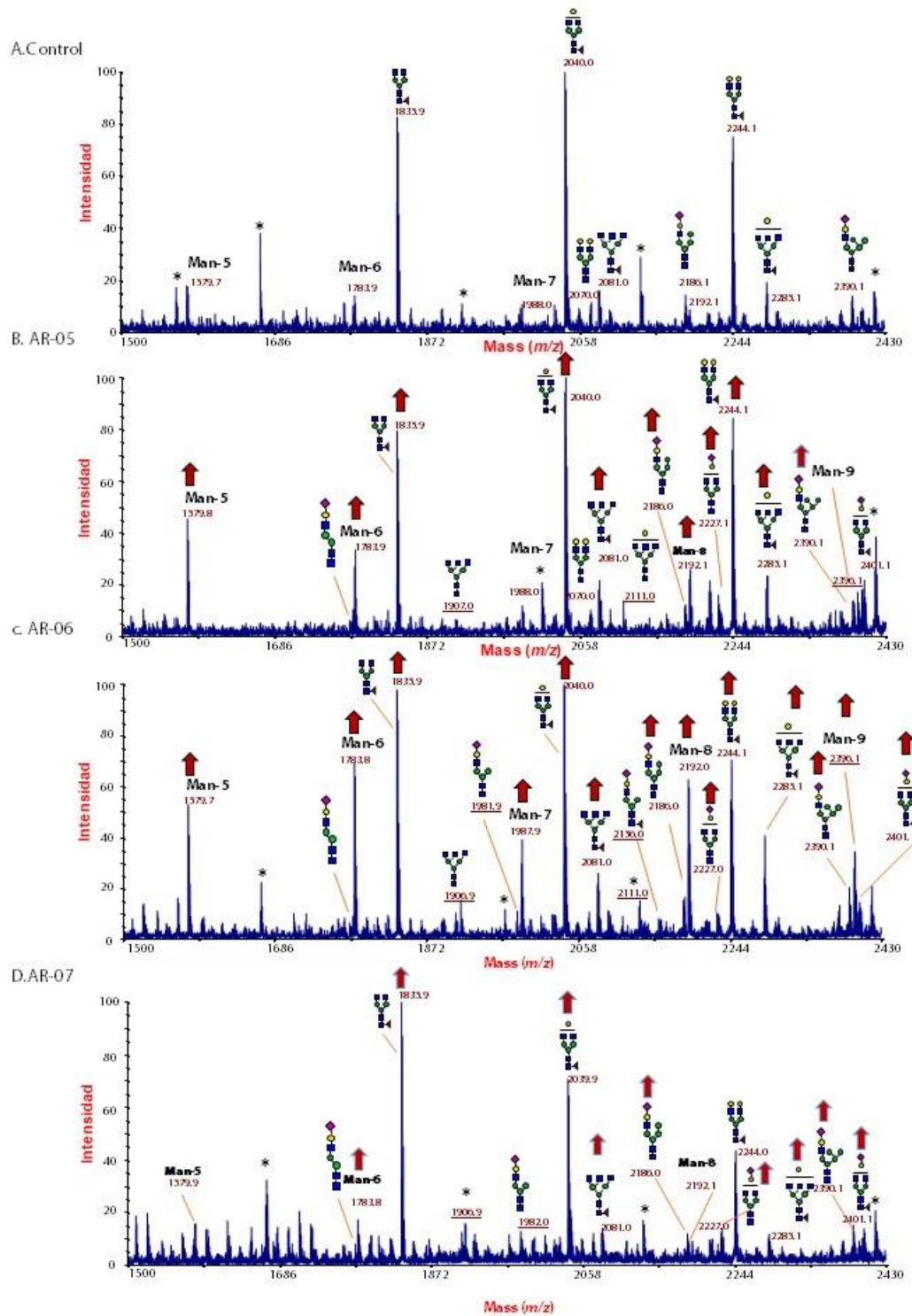


Figura 20. Espectro de masas MALDI de rango de masas bajo (m/z 1500-2430) de N-glicanos de suero permetilados. A: control, B: AR05, C: ARG06, D: AR07. Las flechas rojas indican aumento en estructuras de glicanos específicas, mientras que las masas moleculares subrayadas se refieren a estructuras observadas en pacientes CDG y no detectadas en el control. Símbolos de

glicanos: GlcNAc, cuadrado azul; Man, círculo verde; Gal, círculo amarillo; NeuAc, cuadrado morado; asterisco, contaminantes

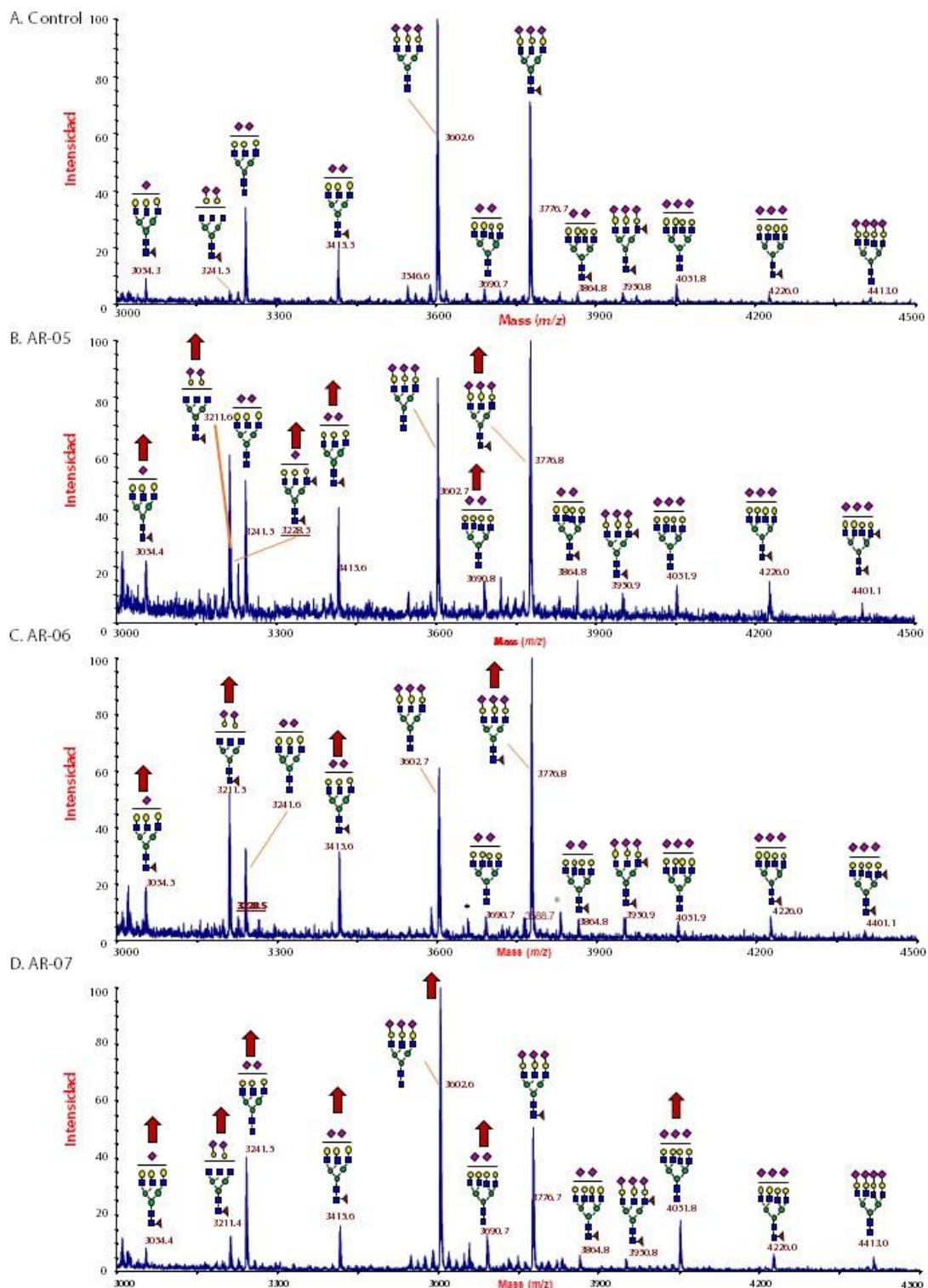


Figura 21. Espectro de masas MALDI de alto rango de masa (m/z 3000-4500) de N-glicanos de suero permetilados. Control (A), AR05 (B), AR06 (C) y AR07 (D). Las flechas rojas indican

aumento de estructuras de glicanos específicas, mientras que las masas moleculares subrayadas se refieren a estructuras observadas en pacientes CDG que no detectan el control. Símbolos de glicanos: GlcNAc, cuadrado azul; Man, círculo verde; Gal, círculo amarillo; NeuAc, cuadrado morado; asterisco, contaminantes.

Tabla X: Datos glicómicos obtenidos del análisis de glicanos en suero y Tf por EM

Composición	Masa teórica [M + Na] ⁺	Masa observada (cobertura) [M + Na] ⁺	Precisión de Masa (ppm)	Intensidad relativa de Tf sérica N-glicanos (%)				Intensidad relativa de N-glicanos totales en suero (%)			
				Controles	AR05	AR06	AR07	Control es	AR05	AR06	AR07
Man ₅ GlcNAc ₂	1579.783	1579.776	4	-	trazas	1.50	-	1.85	7.48	5.10	1.82
NeuAc ₁ Gal ₁ Man ₂ GlcNAc ₃	1777.883	1777.961	44	-	trazas	trazas	trazas	-	trazas	trazas	trazas
Man ₆ GlcNAc ₂	1783.883	1783.905	12	-	trazas	1.67	-	1.08	5.53	6.57	1.52

Man ₃ GlcNAc ₄ Fuc 1	1835.926	1835.915	6	-	1.21	1.55	trazas	5.95	15.60	9.63	12.07
Man ₃ GlcNAc ₅	1906.963	1906.923	21	-	-	trazas	trazas	-	1.84	trazas	trazas
NeuAc ₁ Gal ₁ Man ₃ GlcNAc ₃	1981.984	1981.991	4	-	1.05	1.11	trazas	trazas	trazas	trazas	1.37
Man ₇ GlcNAc ₂	1987.983	1987.976	4	-	trazas	trazas	-	trazas	2.23	3.02	trazas
Gal ₁ Man ₃ GlcNAc 4Fuc ₁	2040.025	2040.020	2	-	trazas	2.20	trazas	7.63	20.16	10.98	8.21
Gal ₂ Man ₃ GlcNAc				traza							

4	2070.036	2070.030	3	s	1.52	2.36	trazas	1.24	2.56	1.1	1.48
Man ₃ GlcNAc ₅ Fuc ₁	2081.052	2081.029	11	-	-	trazas	trazas	1.17	3.84	2.26	1.74
Gal ₁ Man ₃ GlcNAc ₅	2111.062	2111.084	10	-	trazas	trazas	trazas	trazas	1.55	trazas	-
NeuAc ₁ Gal ₁ Man ₃ GlcNAc ₃ Fuc ₁	2156.073	2156.035	18	-	-	trazas	-	trazas	-	trazas	trazas
NeuAc ₁ Gal ₁ Man ₄	2186.083	2186.068	7	-	trazas	1.51	trazas	1.20	2.47	1.44	1.51

GlcNAc ₃											
Man ₈ GlcNAc ₂	2192.083	2192.066	8	-	-	1.10	-	trazas	3.73	5.13	trazas
NeuAc ₁ Gal ₁ Man ₃ GlcNAc ₄	2227.110	2227.098	5	-	trazas	1.15	trazas	traces	2.44	1.22	1.60
Gal ₂ Man ₃ GlcNAc Fuc ₁	2244.125	2244.106	8	traza s	trazas	2.54	trazas	5.02	15.08	6.52	4.81
Gal ₁ Man ₃ GlcNAc Fuc ₁	2285.152	2285.138	6	-	trazas	trazas	trazas	1.25	4.51	3.06	1.44
NeuAc ₁ Gal ₁ Man ₄ GlcNAc ₃ Fuc ₁	2360.173	2360.171	1	-	-	trazas	trazas	-	trazas	trazas	-

NeuAc ₁ Gal ₁ Man ₅ GlcNAc ₃	2390.183	2390.160	10	-	trazas	1.58	trazas	1.35	2.94	1.74	1.90
Man ₉ GlcNAc ₂	2396.183	2396.152	13	-	-	trazas	-	trazas	1.98	2.35	trazas
NeuAc ₁ Gal ₁ Man ₃ GlcNAc ₄ Fuc ₁	2401.199	2401.137	26	-	-	-	-	trazas	2.90	1.12	1.43
NeuAc ₁ Gal ₂ Man ₃ GlcNAc ₄	2431.210	2431.189	9	12.8 9	20.50	43.37	18.42	22.21	39.23	26.22	23.80
NeuAc ₁ Gal ₂ Man ₃ GlcNAc ₄ Fuc ₁	2605.299	2605.277	8	1.46	3.00	6.84	2.50	8.90	22.86	15.03	11.77

NeuAc ₂ Gal ₂ Man ₃ GlcNAc ₄	2792.384	2792.357	10	100	100	100	100	100	100	100	100
NeuAc ₁ Gal ₂ Man ₃ GlcNAc ₅ Fuc ₁	2850.425	2850.394	11	1.30	1.68	4.59	2.41	3.73	13.52	18.67	6.405
NeuAc ₁ Gal ₃ Man ₃ GlcNAc ₅	2880.436	2880.396	14	2.08	2.09	3.24	3.17	1.63	2.76	1.81	3.28
NeuAc ₂ Gal ₂ Man ₃ GlcNAc ₄ Fuc ₁	2966.473	2966.445	9	4.48	5.54	8.92	9.25	7.85	15.15	12.5	18.42
NeuAc ₁ Gal ₃ Man ₃ GlcNAc ₅ Fuc ₁	3054.525	3054.479	15	-	-	trazas	trazas	trazas	2.83	1.61	1.56
NeuAc ₂ Gal ₂ Man ₃ GlcNAc ₄ Fuc ₂	3140.562	3140.454	34	-	-	trazas	trazas	-	-	-	trazas

NeuAc ₂ Gal ₂ Man ₃ GlcNAc ₅ Fuc ₁	3211.599	3211.539	19	-	trazas	trazas	trazas	1.20	4.91	3.86	2.22
NeuAc ₁ Gal ₃ Man ₃ GlcNAc ₅ Fuc ₂	3228.614	3228.547	21	-	-	-	-	-	2.2	trazas	-
NeuAc ₂ Gal ₃ Man ₃ GlcNAc ₅	3241.609	3241.574	11	2.10	2.23	2.36	2.93	4.14	3.80	2.62	6.98
NeuAc ₂ Gal ₃ Man ₃ GlcNAc ₅ Fuc ₁	3415.699	3415.661	11	traza ss	trazas	1.30	trazas	1.39	2.37	2.12	2.33

NeuAc ₃ Gal ₃ Man ₃ GlcNAc ₅	3602.783	3602.744	5	2.73	1.04	trazas	1.81	8.61	4.57	4.41	10.19
NeuAc ₂ Gal ₄ Man ₃ GlcNAc ₆	3690.836	3690.764	19	-	-	trazas	-	trazas	1.49	trazas	1.84
NeuAc ₃ Gal ₃ Man ₃ GlcNAc ₅ Fuc ₁	3776.872	3776.830	11	1.32	trazas	1.06	trazas	4.47	6.36	5.19	7.09
NeuAc ₂ Gal ₄ Man ₃ GlcNAc ₆ Fuc ₁	3864.923	3864.826	25	-	-	trazas	-	trazas	trazas	trazas	trazas
NeuAc ₃ Gal ₃ Man ₃ GlcNAc ₅ Fuc ₂	3950.962	3950.879	21	-	-	trazas	-	trazas	trazas	trazas	trazas

NeuAc ₃ Gal ₄ Man ₃ GlcNAc ₆	4052.009	4051.927	20	-	-	-	-	trazas	ttrazas	trazas	1.96
NeuAc ₃ Gal ₄ Man ₃ GlcNAc ₆ Fuc ₁	4226.098	4226.012	20	-	-	-	-	trazas	ttrazas	ttrazas	ttrazas
NeuAc ₄ Gal ₄ Man ₃ GlcNAc ₆	4413.183	4413.066	26	-	-	-	-	ttrazas	-	-	ttrazas

2.0 Caracterización glicómica de proteínas de membrana plaquetaria en PMM2-CDG

2.1 Evaluación hemostática del paciente AR02PMM2-CDG.

Las alteraciones plaquetarias y hemostáticas son las manifestaciones clínicas más frecuentes en PMM2-CDG; sin embargo, las bases moleculares que podrían relacionar estas dos entidades, permanecen pobremente estudiadas (De La Morena-Barrio et al., 2014). A tal efecto, se propuso evaluar el estado hemostático y plaquetario del paciente PMM2-CDG (**AR02**), así como el perfil glicómico de la membrana plaquetaria.

Este paciente fue diagnosticado previo a este trabajo de tesis, y concurre a CEMECO anualmente para control. Actualmente tiene 10 años y no presenta historial de alteraciones hemostáticas y/o plaquetarias, salvo un pequeño derrame pericárdico en 2018 que se controla periódicamente. Con respecto a la evaluación hematológica y hemostática, el estudio citológico de sangre periférica mostró valores normales de la serie eritroide y serie blanco, como así también morfología y recuento plaquetario ($381/\text{mm}^3$; VN: $150\text{--}450/\text{mm}^3$). Presentó valores de Tiempo de protrombina, quick fibrinógenos e Inhibidores de la coagulación normales; y el KPTT al límite superior pero dentro de rangos normales. Los factores de coagulación también resultaron normales, a excepción del Factor IX y XI que mostraron valores levemente bajos. Los valores obtenidos se resumen en la **tabla XI**.

El estado de agregación plaquetaria del paciente **AR02** se determinó en un agregómetro en tiempo real en una muestra de PRP (Koltai et al., 2017). Este estudio se realizó con estimulación de la agregación plaquetaria en presencia de distintos agonistas, como ADP, ácido araquidónico, colágeno y ristocetina. En el gráfico (no mostrado) se representa una curva de agregación plaquetaria (%) en función del tiempo, la cual es típicamente bifásica (agregación primaria y secundaria) con 5 etapas distintas: 1. Incremento inicial de la transmisión de la luz atribuible a dilución del PRP por el agonista que se añade. 2. Discreta disminución de la transmisión conforme las plaquetas cambian de forma. 3. Incremento agudo inicial de la transmisión conforme las plaquetas se agregan (agregación primaria). 4. Meseta breve o disminución de la agregación. 5. Agregación secundaria que se estimula por la secreción de los gránulos plaquetarios (Huggo Córdova Pluma et al., 2011; Koltai et al., 2017).

En el paciente PMM2-CDG (AR02), se observó una agregación primaria disminuida y agregación secundaria ausente, bajo inducción con ADP a concentraciones bajas ($2,5\text{ }\mu\text{M}$), situación que se mantuvo invariable con concentraciones mayores ($5\text{ }\mu\text{M}$). El mismo

resultado se observó frente a la inducción con epinefrina (5µM). En presencia de colágeno (1µg/ml) ácido araquidónico (1 mM) y ristocetina la agregación plaquetaria resultó normal.

Tabla XI: Determinaciones hemostáticas en PMM2-CDG (AR02).

Determinación	AR02	Valor Normal
KPTT	42''	30''-43''
Quick	80%	70%-120%
Tiempo de protrombina	16''	14''- 18''
Fibrinógeno	288 mg/dl	150- 350 mg/dl
Factores de coagulación		
Factor II	143%	70%-120%
Factor V	93%	70%-120%
Factor VII	128%	70%-120%
Factor X	81%	70%-120%
Factor VIII	100%	50% - 150%
Factor IX	53%	70%- 120%
Factor XI	65%	70%- 120%
Inhibidores de la coagulación		
Proteína S	140%	70%- 120%
Proteína C	86%	75%- 140%
Antitrombina III	89%	80%- 120%
Factores protrombóticos		
Anticoagulante Lúpico	NEGATIVO	
Anticardiolipinas	NEGATIVA	
Beta 2 Glicoproteína I	NEGATIVA	

2.2 Caracterización del perfil glicómico en membrana plaquetaria de PMM2-CDG (AR02)

El perfil de glicanos en membrana plaquetaria se analizó por citometría de flujo, mediante la utilización de un panel de lectinas específicas (**Ver Tabla VII**). En primer lugar, se evaluó la expresión de CD41⁺ (anticuerpo que identifica la población plaquetaria). No se observaron diferencias significativas de células CD41⁺ entre el paciente y los controles

normales, en concordancia con los datos del estudio citológico. Los parámetros de dispersión de luz frontal (*FSC*) y lateral (*SSC*) también fueron similares (**Figura22**).

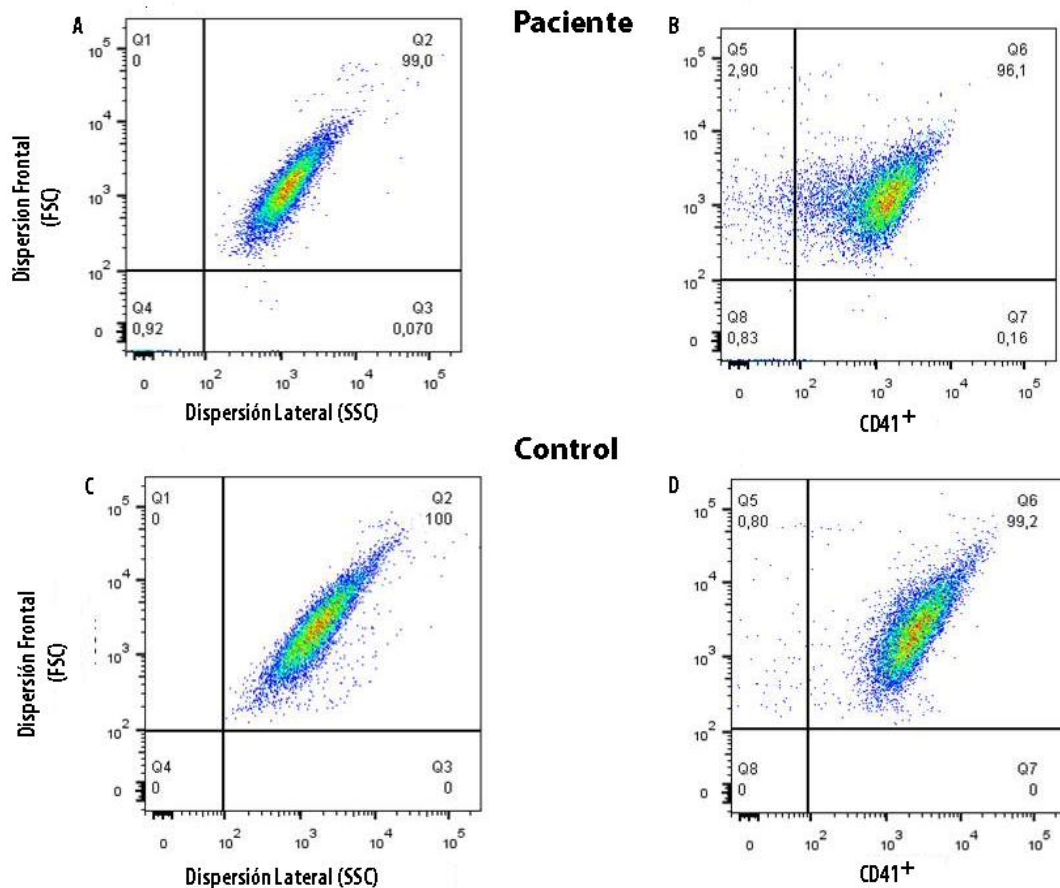
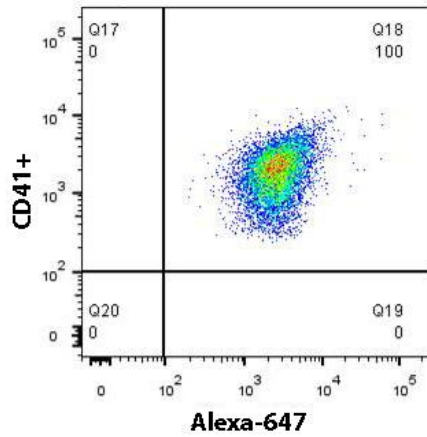


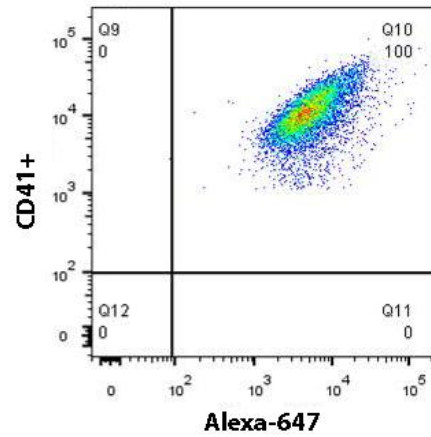
Figura 22. Expresión de CD41⁺ en plaquetas de paciente PMM2-CDG vs control normal A y C: Dispersión Frontal (FSC) y Lateral (SSC) de la población plaquetaria. B y D: Gate de la población CD41⁺ en el paciente y control.

Respecto al estudio glicómico de membrana plaquetaria, la detección de las siguientes lectinas: AAL (reconoce fucosa- α 1,6) CON-A (reconoce α –Manosa), UEA-I (detecta α -Fucosa), RCA-I (se une a β -Galactosa) , MAA-I (reconoce Acido Siálico unido a Galactosa α 2,3) y WGA (identifica N-acetilglucosamina y Acido Siálico) resultaron positivas, es decir, se expresan en la población plaquetaria tanto del paciente como de los controles normales. A continuación, se pueden observar los gráficos (*dot-plots*) correspondientes con el porcentaje de células positivas para cada lectina en el control y paciente (**Figuras 23, 24 y 25**).

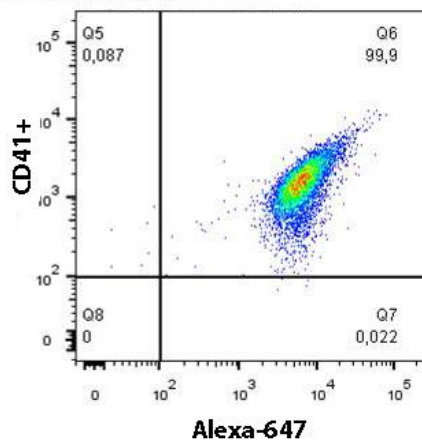
A. Paciente -AAL



B. Control -AAL



C. Paciente -CON-A



D. Control-CON-A

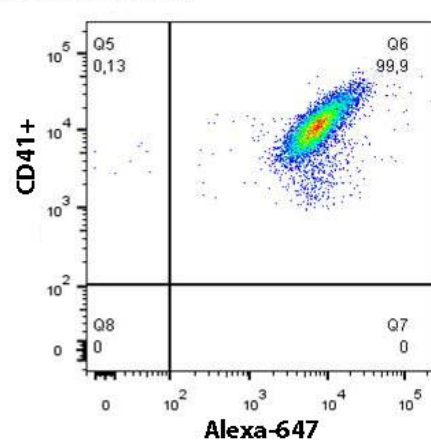
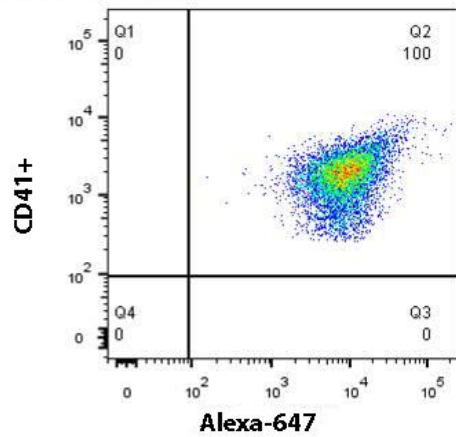
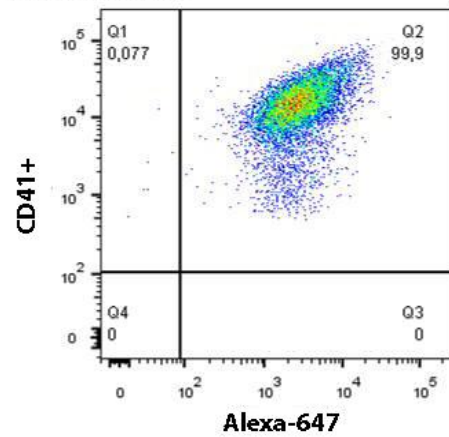


Figura 23. Dot-plot de la expresión de AAL Y CON-A. **A:** Dot-plot de la expresión de AAL (Alexa-647) en población CD41⁺ del paciente. **B:** Dot-plot de la expresión de AAL (Alexa-647) en población CD41⁺ del control. **C:** Dot-plot de la expresión de CON-A (Alexa-647) en población CD41⁺ en el paciente. **D:** Dot-plot de la expresión de CON-A (Alexa-647) en población CD41⁺ del control.

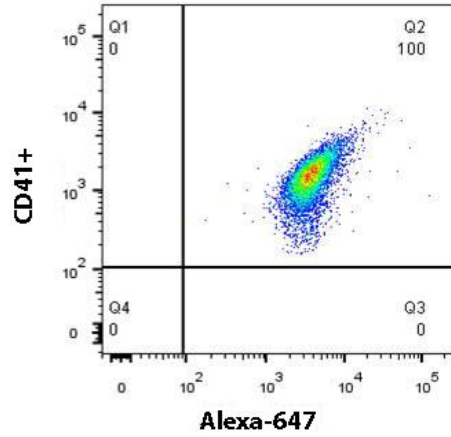
A. Paciente UEA-I



B. Control UEA-I



C. Paciente MAA-I



D. Control MAA-I

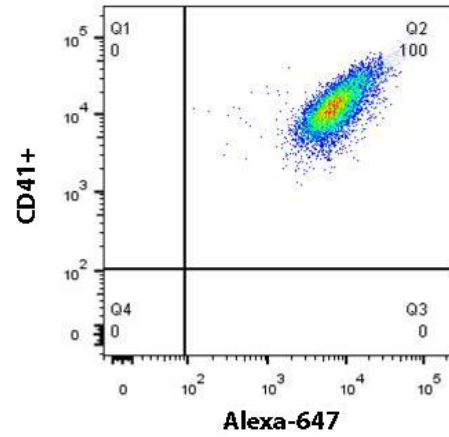


Figura 24. Dot-plot de la expresión de UEA-I y MAA-I. **A:** Dot-plot de la expresión de UEA-I (Alexa-647) en población CD41⁺ del paciente. **B:** Dot-plot de la expresión de UEA-I (Alexa-647) en población CD41⁺ del control. **C:** Dot-plot de la expresión de MAA-I (Alexa-647) en población CD41⁺ en el paciente. **D:** Dot-plot de la expresión de MAA-I (Alexa-647) en la población CD41⁺ del control.

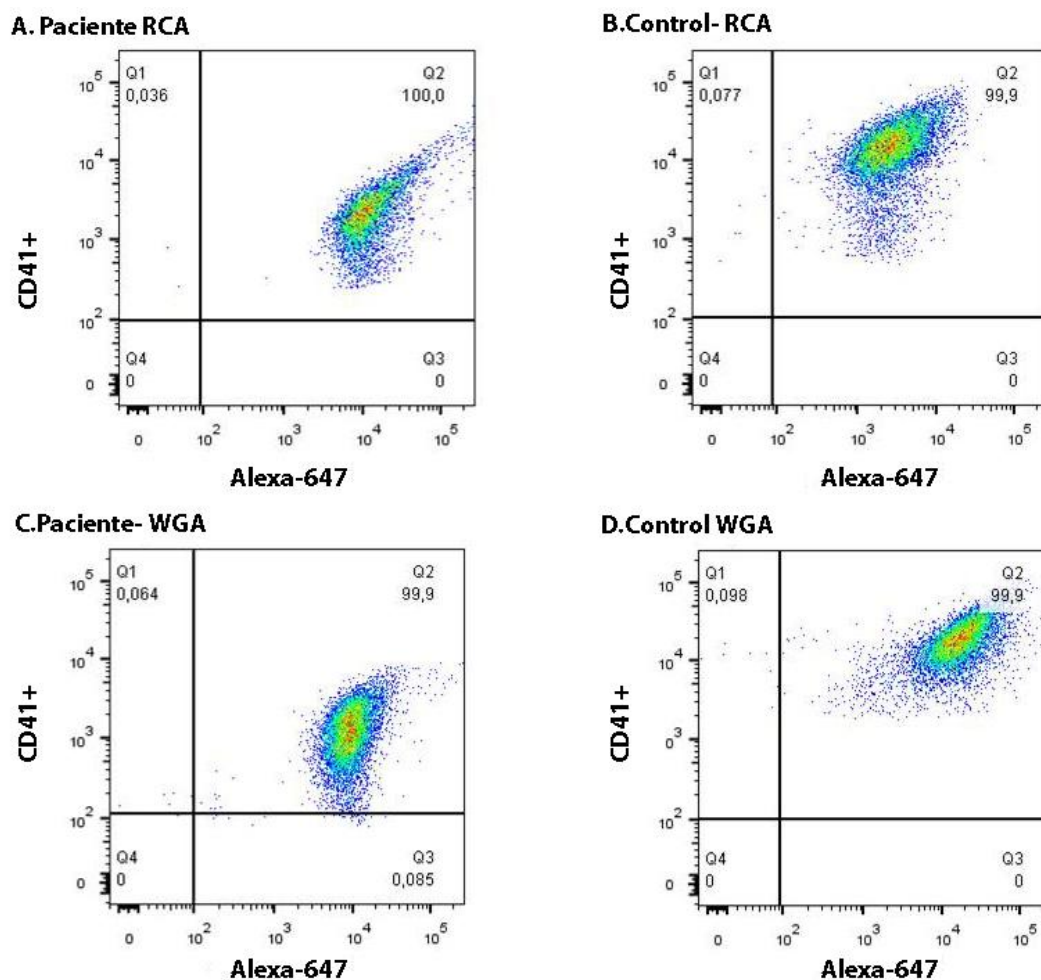


Figura 25. Dot-plot de la expresión de RCA y WGA. **A:** Dot-plot de la expresión de RCA (Alexa-647) en la población CD41⁺ del paciente. **B:** Dot-plot de la expresión de RCA (Alexa-647) en población CD41⁺ del control. **C:** Dot-plot de la expresión de WGA (Alexa-647) en población CD41⁺ en el paciente. **D:** Dot-plot de la expresión de WGA (Alexa-647) en población CD41⁺ del control.

A pesar de resultar positiva la marcación de estas lectinas, tanto en la población plaquetaria correspondiente al paciente como la de los controles normales, el análisis estadístico evaluando la IMF no mostró diferencias significativas entre ambos. Aunque se observó una tendencia, en la disminución de WGA (que reconoce Ac. Siálico y N-acetilglucosamina) en el paciente con respecto a los controles normales.

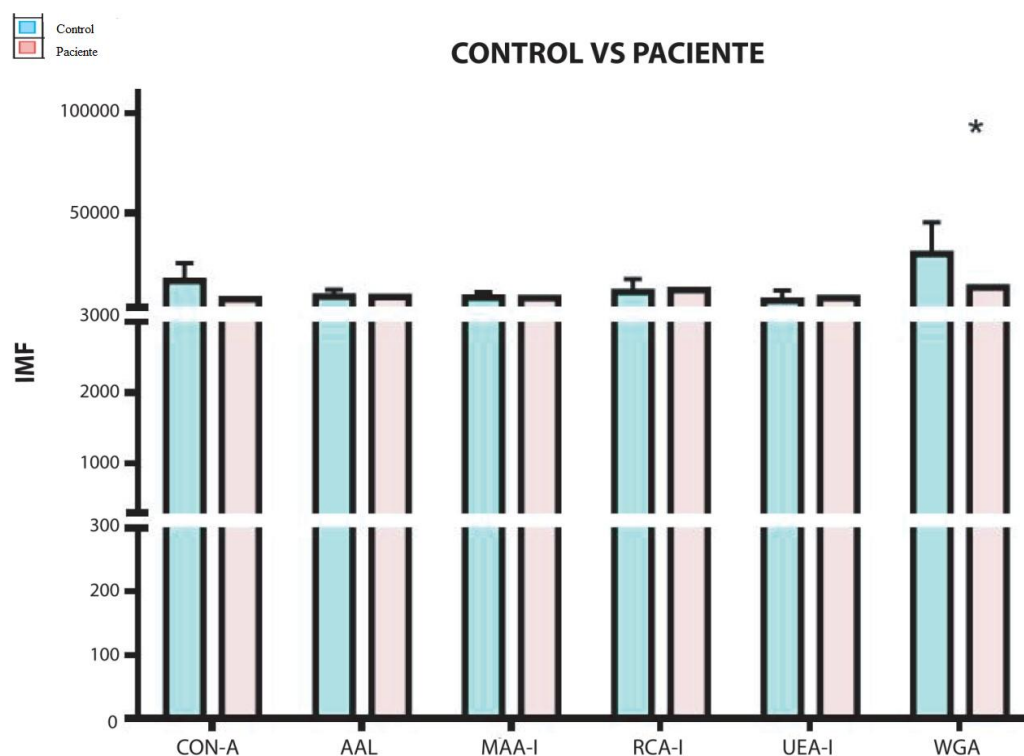


Figura 26. Grafico de barras que indica el binding de lectinas a los glicanos estudiados en membrana plaquetaria. Se compara la IMF del paciente para cada lectina con la IMF de los controles (n=6).

Las lectinas GSL-I y GSL-II, mostraron valores de fluorescencia basal similares en las muestras comparadas (**Figura 27**). Esta observación, determina que los glicanos reconocidos por estas lectinas, N-Acetilgalactosamina en el caso de GSL-I y N-acetilglucosamina para GSL-II, se expresan en muy bajas cantidades.

En la marcación con GSL-I pudimos observar una expresión de esta lectina del 2,08% de las células CD41⁺ del control, respecto a un 12% de células CD41⁺ que expresan dicha lectina en el paciente (**Figura 27 A y B**).

En el caso de GSL-II, la expresión fue un poco mayor en el control, ya que el 30,7% de las células CD41⁺ resultaron positivas, en cambio en el paciente se observó un 26,5% de células positivas (**Figura 27 C y D**).

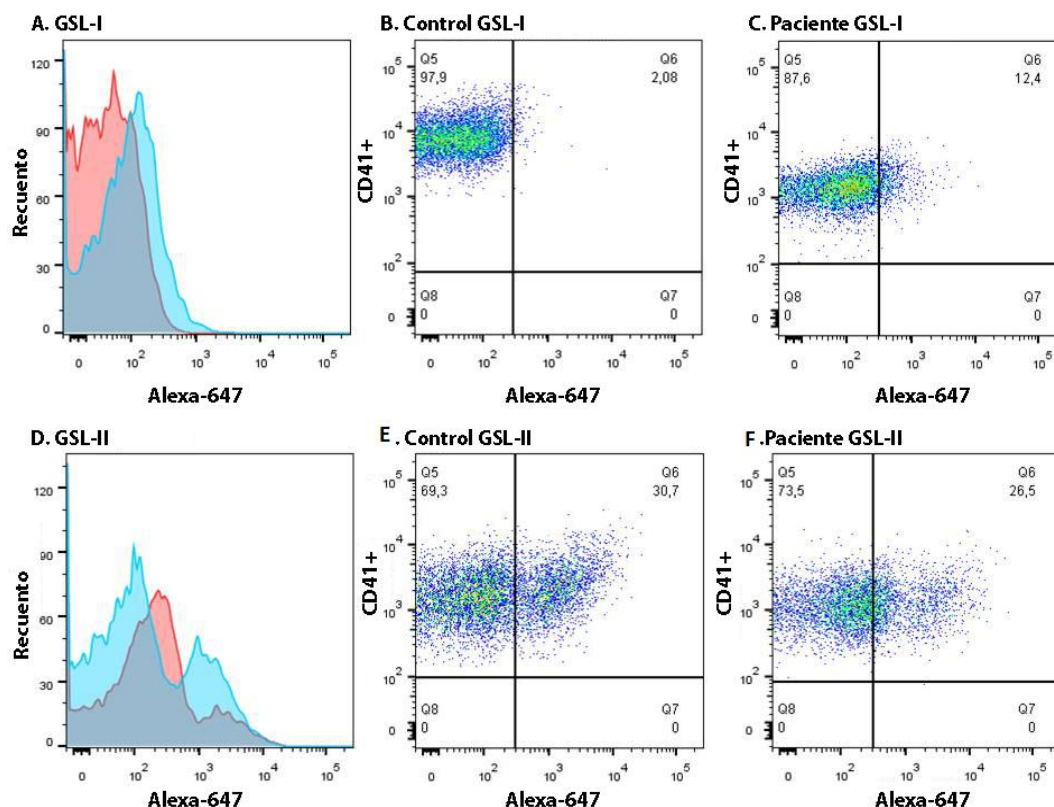


Figura 27. Expresión GSL-I y GSL-II en membrana plaquetaria
A: Histograma IMF de GSL-I Control vs Paciente **B:** Dot-plot población $CD41^{+}$ que expresa GSL-I en el control **C:** Dot-plot población $CD41^{+}$ que expresa GSL-I en el paciente. **D:** Histograma IMF de GSL-I Control vs Paciente. **E:** Dot-plot población $CD41^{+}$ que expresa GSL-II en el control **F:** Dot-plot población $CD41^{+}$ que expresa GSL-II en el paciente.

En lo que respecta a la determinación de la lectina PNA, que reconoce β -1, N-acetilgalactosamina (Core 1 O-Glicanos), se observó una mayor expresión en membrana plaquetaria de la muestra perteneciente al paciente (98,8% de células $CD41^{+}$) respecto al grupo control, donde su expresión resultó menor (27,4%) (**Figura 28**).

De la misma forma, el análisis estadístico arrojó resultados significativos ($p=0,0238$), demostrando un aumento de la expresión de la lectina PNA en el paciente, respecto al grupo control (**Figura 29**).

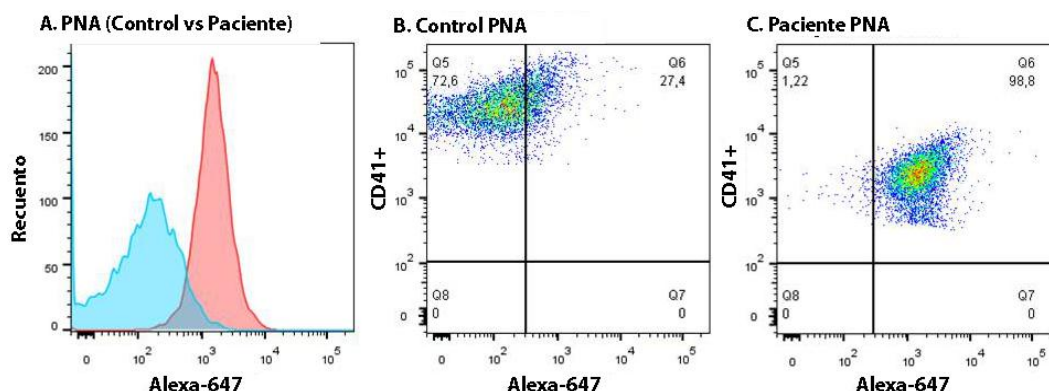


Figura 28. Expresión PNA en membrana plaquetaria. **A:** Histograma IMF de PNA en el Control vs Paciente **B:** Dot-plot población CD41⁺ que expresa PNA en el control **C:** Dot- plot población CD41⁺ que expresa PNA en el paciente.

La expresión de SNA, que reconoce Acido Siálico en posición 2,6, resultó positiva, tanto en la población CD41⁺ del grupo control, como en la población CD41⁺ perteneciente al paciente (**Figura 29**).

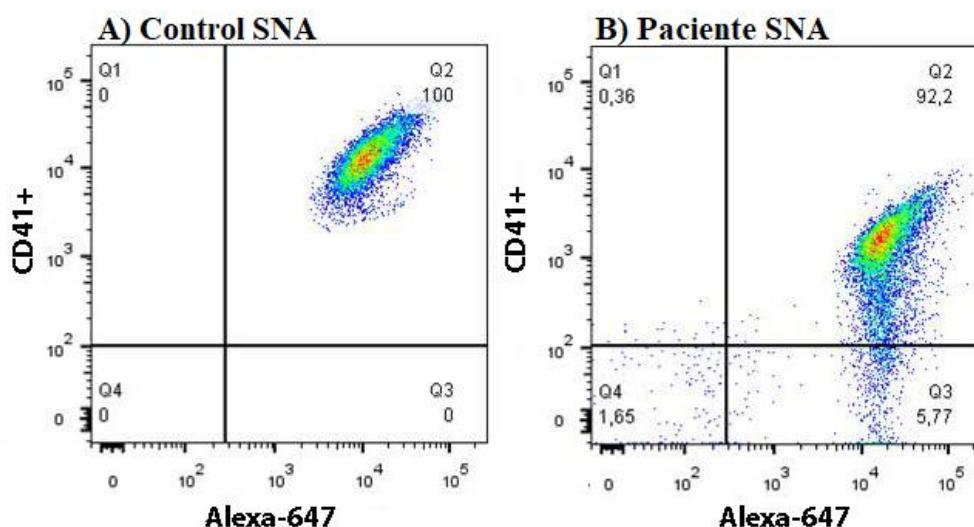


Figura 29. Expresión SNA en membrana plaquetaria **A:** Dot-plot expresión SNA en población CD41⁺ del control. **B:** Dot-plot expresión SNA en población CD41⁺ del paciente.

La fluorescencia detectada mediante marcación con SNA resultó disminuida en el paciente AR02 respecto del grupo control (**Figura 29**). El análisis estadístico mediante una prueba *t de Student* corroboró una diferencia significativa ($p < 0,027$).

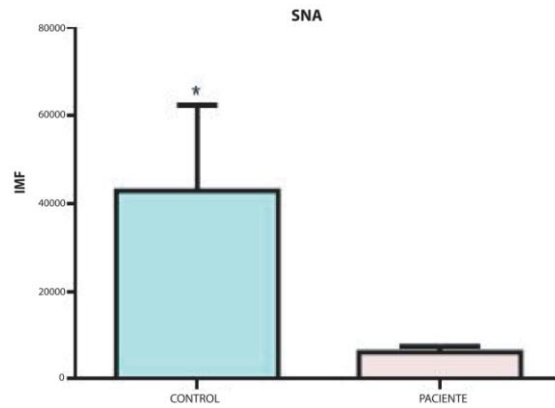


Figura30. Análisis estadístico de unión (*binding*) de SNA en membrana plaquetaria. Se compara la IMF del paciente vs. la IMF de los controles ($p=0,027$).

Para el análisis estadístico de estos valores observados de unión a las lectinas, fueron consideradas todas las mediciones obtenidas para el paciente. Estadísticamente, cada valor debería ser considerado como pseudoréplica (Ranstam, 2012), sin embargo, nos vimos obligados a proceder de esta manera debido a la imposibilidad de hacer un análisis estadístico correcto teniendo un solo valor promedio para el paciente PMM2-CDG (**AR02**). Para salvar este error, llevamos a cabo un análisis en base a lo establecido por Mycroft et al.(2002), calculando un valor F de Fisher modificado.

Discusión

Con el advenimiento de las herramientas de Secuenciación masiva se comenzaron a reportar nuevas variantes patogénicas asociadas a genes involucrados en la vía de N-glicosilación. En muchos casos, corresponden a genes no conocidos hasta el momento, o bien, como es el caso de nuestros pacientes ALG2-CDG, nuevas mutaciones en genes con muy baja incidencia a nivel mundial (Ng & Freeze, 2018). En este sentido, se hace imperiosa la necesidad de caracterizar estos nuevos tipos de CDG, contribuyendo al algoritmo diagnóstico, mediante la detección de posibles relaciones entre genotipo-fenotipo y de manera específica, mediante la descripción del glicofenotipo asociado a estos pacientes CDG. A tal efecto, la glicómica es un área de estudio en desarrollo exponencial que cuenta con diversas herramientas de gran utilidad para la determinación del glicofenotipo, abriendo una nueva puerta a la caracterización y descripción de diferentes clases de CDG. Este capítulo de tesis se centró en la caracterización del perfil de glicanos ya sean totales en suero o específicamente unidos a Tf de tres pacientes ALG2-CDG que presentan una variante génica inédita en homocigosis. Conjuntamente, se caracterizó el perfil hemostático y el perfil de glicanos de membrana plaquetaria de un paciente PMM2-CDG. Si bien PMM2-CDG es el tipo de CDG más frecuente y más estudiado a nivel mundial (Jaeken, 2010), poco se sabe al respecto de la expresión de glicanos en plaquetas, estándolos mismos estrechamente asociados a procesos trombóticos y/o hemorrágicos, frecuentemente observados en PMM2-CDG, entre otras clases de CDG.

Dado que la mayoría de los CDG conocidos hasta el momento implican un defecto en la ruta biosintética de la N-glicosilación de proteínas (Freeze et al., 2015), el análisis de los N-glicanos plasmáticos por MS juega un papel fundamental en la investigación y el diagnóstico de estas patologías. Existen dos enfoques para el estudio y la caracterización de los mismos: los glicanos plasmáticos totales (estructuras de N-glicanos liberadas de manera completa de las glicoproteínas totales de plasma o suero) y el glicofenotipo específico de una N-glicoproteína (por ejemplo, Tf o ApoCIII) (Abu Bakar et al., 2018). El perfil específico de N-glicanos unidos a proteínas séricas totales y de N-glicanos unidos a Tf, que ofrece esta metodología facilitan el estudio de estructuras complejas con alta especificidad y sensibilidad (Sturiale et al., 2011; Jaeken & Péanne, 2017; Abu Bakar et al., 2018). Conjuntamente, los avances de los últimos años en el desarrollo de las herramientas

de secuenciación genómica y bioinformática, han permitido el descubrimiento y la caracterización de numerosos genes implicados en CDG cuyo perfil glicómico es poco conocido (Abu Bakar et al., 2018; L.C. Tegtmeyer et al., 2015). Por lo tanto, la integración de la glicómica con la genómica han dado como resultado el esclarecimiento y caracterización de numerosos CDGs previamente desconocidos (Jaeken & Péanne, 2017; Abu Bakar et al., 2018).

En este trabajo de tesis, utilizamos MALDI-TOF, para caracterizar el perfil de N-glicanos totales de suero y N-glicanos presentes en la Tf intacta, específicamente en tres pacientes argentinos **ALG2-CDG (AR05, AR06 y AR07)** descritos en el Capítulo I debido a que presentaban una nueva variante *missense* en homocigosis en el gen *ALG2*, no reportada previamente y cuyo efecto patogénico no estaba caracterizado.

Todos los pacientes ALG2-CDG diagnosticados en nuestro centro (n=3) (**Tabla IX**) presentan la misma mutación en el exón 2 del gen *ALG2* (que codifica para la enzima alfa 1,3-manosiltransferasa) en homocigosis (c.752G>T, p.Arg251Leu). Esta enzima cataliza la transferencia de un residuo de manosa desde GDP-Manosa al *core* de N-glicanos en formación (Man1GlcNAc2-PP-dolichol) (Thiel et al., 2003). La deficiencia de ALG2 podría interrumpir la formación de glicanos más complejos, interfiriendo en el correcto funcionamiento de las glicoproteínas involucradas en esta ruta metabólica. Los estudios de N-glicanos totales en suero y específicos de Tf sérica desarrollados en este capítulo, evidencian en los pacientes **ALG2-CDG** una alteración en la biosíntesis de N-glicanos, en concordancia con los estudios realizados (IEF-Tf) en los cuales se observó un patrón CDG-I. La presencia de glicanos monosialilados, y el aumento de formas fucosiladas y de isoformas truncas, sugieren una alteración en la ruta biosintética de los oligosacáridos unidos a dolicol, previo a la unión del grupo o *core* glicano a la proteína (Thiel et al., 2003). Estos resultados, contribuyen a validar de manera indirecta que las variantes génicas encontradas en nuestros pacientes producen una alteración de la vía de N-glicosilación. En el estudio del perfil de N-glicanos de Tf, además de observarse defectos de ensamblaje en los glicanos característicos de CDG-I (alteraciones en RE), también podemos apreciar cambios en la glicosilación debidos a un procesamiento anómalo de la N-glicoproteínas, asociado a alteraciones en AG. Este hallazgo podría deberse a una actividad dual de la enzima α 1, 3-manosiltransferasa. Un reporte previo demuestra que *ALG2* codifica una glicosiltransferasa bifuncional caracterizando a *alg2* como una enzima bifuncional que se requiere para la transferencia del

residuo unido a α 1,3 y α 1,6-manosa de GDP-manosa a Man1GlcNAc2-PP-Dol formando el intermediario Man3GlcNAc2-PP-Dol en el lado citosólico del RE (Gao et al., 2004; Pontén et al., 2009). Estas funciones duales de las proteínas, tanto en alg2, como en alg11, son esenciales en la biosíntesis de N-glicoproteínas (Hudson H. Freeze, et al., 2006). La correcta glicosilación y localización de enzimas, glicoproteínas implicadas en esta vía ya sea en el RE como en el aparato de Golgi, dictamina la correcta estructura de los glicanos y, por lo tanto, las propiedades y funciones de las glicoproteínas y glicolípidos. La especificidad de la síntesis de glicanos bien podría estar sujeta a la regulación espacial y temporal dentro del Golgi durante varios estados del desarrollo y asociados también a la enfermedad. Se podría correlacionar anomalías en dichas estructuras glicosídicas con el perfil de glicanos observados en el CDG tipo I y asociado con un trastorno leve del aparato de Golgi (CDG tipo II). En este trabajo sugerimos que se observa en los pacientes ALG2-CDG una ligera anomalía de Golgi, ya descrita en otros CDG tipo I como por ejemplo ALG12-CDG (Sturiale et al., 2019). En particular, se puede hipotetizar que, como fue demostrado para la deficiencia de 1,6-manosiltransferasa (ALG12) (Quintana et al., 2009), las cantidades aumentadas de especies ricas en manosa e híbridas bien pueden atribuirse a la alfa-1,3 / 1, defecto molecular de la 6-manosiltransferasa, ya que, actúan en la primera parte de la vía de N-glicosilación en RE (Pontén et al., 2009; Biosynthesis et al., 2006; Gao et al., 2004). En conjunto, una actividad compensadora de este complejo en las vías postraduccionales implicadas en la glicosilación se ha asociado a una variación intra e interfamiliar de fenotipos clínicos. En este sentido, se informó una amplia heterogeneidad clínica en los pacientes ALG2-CDG aquí estudiados, que presentaban la misma mutación sin sentido (Jaeken & Péanne, 2017). La funcionalidad de las glicosiltransferasas que forman dos enlaces es bastante inusual pero no sin precedentes. Por ejemplo, la enzima hialurón sintasa, tiene una actividad de β -1,3-N-acetilglucosamina y de ácido β -1,4-glucurónico transferasa, alargando las cadenas de heparán sulfato. El defecto genético ocasiona que EXT1 / EXT2-CDG sea uno de los CDG más frecuentes.

La profundización en el conocimiento específico de los cambios de glicosilación en estas patologías, ha demostrado ser útil para conocer con mayor especificidad el mecanismo patológico que se origina a partir del defecto molecular, proporcionando una herramienta de estudio valiosa para el diagnóstico de CDG. Identificar rasgos glicómicos específicos, permite reconocer glicofenotipos determinados (ver Tabla XII) asociados a una posible correlación con las manifestaciones clínicas observadas en estos pacientes.

Tabla XII: Perfiles Glicómicos observados en distintos tipos de CDG.

CDG	Glicofenotipo por EM
PMM2-CDG	Aumento de tetrasacáridos sialilados en plasma: NeuAc ₁ -Gal ₁ -GlcNAc _{2,3} manosa (Man ₃ -GlcNAc ₂) y 4 manosa (Man ₄ -GlcNAc ₂) (Zhang et al., 2016)
MPI-CDG	Aumento de tetrasacárido sialilado plasmático: NeuAc ₁ -Gal ₁ -GlcNAc _{2,3} manosa (Man ₃ -GlcNAc ₂) y 4 manosa glicanos (Man ₄ -GlcNAc ₂)(Zhang et al., 2016).
ALG1-CDG	Aumento de glicanos sialilados en plasma:: NeuAc ₁ -Gal ₁ -GlcNAc _{2,3} manosa (Man ₃ -GlcNAc ₂) y 4 manosa (Man ₄ -GlcNAc ₂) (Zhang et al., 2016). Aumento de trisialo y monosialo transferrina con el tetrasacárido asialilado: NeuAc ₁ -Gal ₁ -GlcNAc ₂ y/o glicofomas biantenarias disialiladas (Bengtson et al., 2016).
ALG12-CDG	Aumento de glicanos híbridos y ricos en manosa en Ig G sérica y glicanos totales de suero (Sturiale et al., 2019)
ALG2-CDG	Aumento de glicanos híbridos y ricos en manosa. Aumento general de formas hiposialiladas (Papazoglu et al., 2020)

Respecto a los estudios glicómicos realizados por citometría de flujo el paciente PMM2-CDG, se observó que las proteínas plaquetarias de membrana plaquetaria están principalmente N-glicosiladas. La expresión de la lectina SNA, que reconoce el ácido siálico terminal en la posición 2.6, disminuye significativamente en el paciente PMM2-CDG ($p=0,027$), lo que indica un menor contenido de ácido siálico en las glicoproteínas plaquetarias. Esta disminución en la expresión de ácido siálico podría aumentar el clearance de plaquetas, lo que se traduciría en un menor número de plaquetas en la sangre periférica y,

en consecuencia, el riesgo potencial de hemorragia en estos pacientes (Li et al., 2018). La unión disminuida de la lectina de SNA a las plaquetas de PMM2-CDG podría deberse al efecto de la hipoglicosilación sistémica que presentan estos pacientes. La disfunción de estas glicoproteínas ubicadas en la superficie plaquetaria contribuye a explicar la reactividad plaquetaria espontánea descrita en estos pacientes (De La Morena-Barrio et al. 2014b).

Aunque el paciente PMM2-CDG no presentó eventos hemorrágicos significativos, el análisis de la agregación plaquetaria en respuesta a ADP y epinefrina indica una hiporespuesta a estos agonistas. En la mayoría de los individuos esta respuesta bifásica se observa con concentraciones bajas de ADP y adrenalina. Las curvas que se generan con otros agonistas (colágeno, ristocetina) son típicamente unimodales (Koltai et al., 2017). Esto revela una cierta susceptibilidad a complicaciones hemostáticas que podrían aparecer en respuesta a un estrés metabólico, por ejemplo debido a una cirugía. También observamos valores levemente bajos de Factor IX y XI, y KPTT al límite superior (que podría estar asociado a la disminución del Factor IX). Con este perfil podríamos inferir que el paciente tiene probabilidades de desarrollar a futuro complicaciones hemorrágicas y no sería aconsejable el uso de medicación con actividad de antiagregantes plaquetarios, como la aspirina, ya que podría conducirle a un riesgo aun mayor de hemorragias.

Este trabajo de tesis, muestra por primera vez estudios glicómicos en suero de pacientes ALG2-CDG. Hasta el momento, solo se había reportado el perfil de N-glicanos en suero de pacientes *PMM2*, *MPI*, *ALG1*, *ALG8*, *ALG12*, *MOGS*, *MGAT2*, *MAN1B1*, *COG5*, *COG8*, *COG7*, *ATP6V0A2*, *PGM1*, *PGM3*, *DPAGT*, *SLC35C1* y *SLC35A1* (Abu Bakar, Lefeber y van Scherpenzeel 2018). En conjunto, por primera vez, se realizaron estudios de caracterización del glicofenotipo en membrana de plaquetas de pacientes PMM2-CDG. Futuros estudios serían necesarios para caracterizar las glicoproteínas específicas de membrana plaquetaria involucradas en las alteraciones hemostáticas observadas en la mayoría de los pacientes con PMM2-CDG u otras formas de CDG que fueron reportadas presentan eventos trombo-hemorrágicos frecuentes.

CONCLUSIONES

En el transcurso de esta tesis se caracterizaron las siguientes clases de CDG

- PMM2-CDG (3): AR04, AR08 y AR09.
- ALG2-CDG (3): AR05, AR06 y AR07, siendo los primeros casos de este tipo de CDG identificados en nuestro país, y solo nueve a nivel mundial; a la vez de que reportamos por primera vez la mutación c. 752G>T en homocigosis en el gen *ALG2*.
- COG1-CDG (1): AR10.
- ALG1-CDG (1): AR12.

Se avanzó en la caracterización de alteraciones secundarias de glicosilación no descritas en la literatura. Se logró identificar variantes génicas en pacientes con IEF-Tf alterado en genes no pertenecientes a CDG, contribuyendo al conocimiento y mejora en el diagnóstico de dicha patología.

Se implementó la tecnología NGS en el algoritmo diagnóstico, que en combinación con determinaciones bioquímicas ha revolucionado el diagnóstico de CDG, otorgando mayor precisión en la búsqueda del gen afectado

Por primera vez se determinó el glicofenotipo, mediante el estudio de glicanos totales en suero en pacientes ALG2-CDG, observándose una alteración específica de diferentes espectros de masa de estos pacientes (AR05, AR06 y AR07). Los estudios de N-glicanos totales en suero y específicos de transferrina sérica, muestran en AR05, AR06 Y AR07 una alteración en la biosíntesis de N-glicanos con predominio de formas monosialiladas, fucosiladas y presencia de alteraciones de glicanos de AG.

La implementación de glicómica para el análisis de perfiles de glicanos en suero y Tf podrían ser de gran utilidad como un valor marcador predictivo de severidad de los cambios genéticos detectados en estos pacientes, como así también complementarse junto a otras determinaciones bioquímicas, en una primera etapa de estudio para el diagnóstico de las clases más frecuentes de CDG (PMM2, MPI).

Además, se describió por primera vez el perfil de glicanos presente en proteínas totales de membrana plaquetaria de un paciente PMM2-CDG, ya que solo se conocía la expresión de RCA-I (De La Morena-Barrio et al., 2014). Se observó la expresión de la lectina SNA, que reconoce ac.Siálico terminal, se encuentra significativamente disminuida ($p<0,027$) en el

paciente ARG02 respecto del grupo control, este menor contenido de ácido siálico en la cadena de glicanos de las proteínas plaquetarias. podría incrementar el *clearance* plaquetario, ocasionando un menor número de plaquetas en sangre periférica (plaquetopenia) y por consiguiente, un potencial riesgo de hemorragias en estos pacientes (Li et al., 2018).

El diagnóstico específico de las diferentes clases de CDG, representa un desafío en la actualidad, aun en presencia de herramientas metodológicas innovadoras como las implementadas durante el transcurso de esta tesis. El advenimiento de la Medicina de Precisión o Medicina Personalizada genera un nuevo paradigma en el estudio de estas patologías, principalmente en el advenimiento de terapias específicas que deben adaptarse a cada paciente. En este sentido, el código genómico se asocia al código glicómico de cada individuo, hacia la evolución de una medicina predictiva y correctiva, teniendo en cuenta el advenimiento de herramientas de edición genómica dirigidas a CDG.

BIBLIOGRAFÍA

- ABU BAKAR, N., LEFEBER, D.J., VAN SCHERPENZEEL, M.,. Clinical glycomics for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2018, vol. 41, no. 3, pp. 499-513. ISSN 15732665. DOI 10.1007/s10545-018-0144-9.
- AEBI, M., [et al.]. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* [en línea], 2013, vol. 1833, no. 11, pp. 2430-2437. ISSN 01674889. DOI 10.1016/j.bbamcr.2013.04.001.
- AL TENEIJ, A.,[et al.].Phenotypic and genotypic spectrum of congenital disorders of glycosylation type I and type II. *Molecular Genetics and Metabolism* [en línea], 2017, vol. 120, no. 3, pp. 235-242. ISSN 10967206. DOI 10.1016/j.ymgme.2016.12.014.
- ALTASSAN, R., [et al.].International clinical guidelines for the management of phosphomannomutase 2-congenital disorders of glycosylation: Diagnosis, treatment and follow up. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2019, vol. 42, no. 1, pp. 5-28. ISSN 15732665. DOI 10.1002/jimd.12024.
- AMBARDAR, S., [et al.]. High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian Journal of Microbiology*, 2016, vol. 56, no. 4, pp. 394-404. ISSN 00468991. DOI 10.1007/s12088-016-0606-4.
- ASTEGGIANO, C.G.[et al.]. Ten years of screening for congenital disorders of glycosylation in Argentina: case studies and pitfalls. *Pediatric Research* [en línea], 2018, pp. 1-5. ISSN 15300447. DOI 10.1038/s41390-018-0206-6.
- BAHASSI, E.M., STAMBROOK, P.J. Next-generation sequencing technologies: Breaking the sound barrier of human genetics. *Mutagenesis*, 2014, vol. 29, no. 5, pp. 303-310. ISSN 14643804. DOI 10.1093/mutage/geu031.
- BENGTON, P. [et al.]. Serum transferrin carrying the xeno-tetrasaccharide NeuAc-Gal-GlcNAc2 is a biomarker of ALG1-CDG. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2016, vol. 39, no. 1, pp. 107-114. ISSN 15732665. DOI 10.1007/s10545-015-9884-y.
- BIOSYNTHESIS, N.G. [et al.]. In Vitro Evidence for the Dual Function of Alg2 and Alg11 : Essential, 2016, vol. 14, no. Figure 1, pp. 9593-9603.
- BISTUE, M.B.[et al.].Two Argentinean Siblings with CDG-Ix : A Novel Type of Congenital Disorder of Glycosylation? *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2011. DOI 10.1007/8904.

- BODE, L. [et al.]. Heparan sulfate and syndecan-1 are essential in maintaining murine and human intestinal epithelial barrier function. *Journal of Clinical Investigation*, 2008, vol. 118, no. 1, pp. 229–238. DOI 10.1172/JCI32335.sure.
- BRASIL, S. [et al.]. CDG therapies: From bench to bedside. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, vol. 19, no. 5, pp. 1-47. ISSN 14220067. DOI 10.3390/ijms19051304.
- BRIONES, P. [et al.]. Biochemical and molecular studies in 26 Spanish patients with congenital disorder of glycosylation type Ia. *Journal of inherited metabolic disease*, 2002, vol. 25, no. 8, pp. 635-46.
- BUERMANS, H.P.J.; DEN DUNNEN, J.T.,. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* [en línea], 2014, vol. 1842, no. 10, pp. 1932-1941. ISSN 1879260X. DOI 10.1016/j.bbadis.2014.06.015.
- CERONI, A., [et al.]. GlycoWorkbench: A tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *Journal of Proteome Research*, 2008, vol. 7, no. 4, pp. 1650-1659. ISSN 15353893. DOI 10.1021/pr7008252.
- COSSINS, J.[et al.]. Congenital myasthenic syndromes due to mutations in ALG2 and ALG14. *Brain*, 2013, vol. 136, no. 3, pp. 944-956. ISSN 14602156. DOI 10.1093/brain/awt010.
- DE LA MORENA-BARRIO, M.E.[et al.]. Proteomic analysis of platelet N-glycoproteins in PMM2-CDG patients. *Thrombosis Research* [en línea], 2014, vol. 133, no. 3, pp. 412-417. ISSN 00493848. DOI 10.1016/j.thromres.2013.12.024.
- EVANGELISTA, T., HANNA, M., LOCHMÜLLER, H. Congenital Myasthenic Syndromes with Predominant Limb Girdle Weakness. *Journal of Neuromuscular Diseases*, 2015, vol. 2, pp. S21-S29. ISSN 22143602. DOI 10.3233/JND-150098.
- EWING, B. [et al.]. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 1998, vol. 8, no. 3, pp. 175-185. ISSN 10889051. DOI 10.1101/gr.8.3.175.
- FRANCISCO, R [et al.]. The challenge of CDG diagnosis. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2019, vol. 126, no. September 2018, pp. 1-5. DOI 10.1016/j.ymgme.2018.11.003.
- FREEZE, H.H. [et al.]. Neurology of inherited glycosylation disorders. *The Lancet. Neurology*, 2012, vol. 11, no. 5, pp. 453-66. DOI 10.1016/S1474-4422(12)70040-6.

- FREEZE, H.H. [et al.]. Neurological aspects of human glycosylation disorders. *NHS Public Access*, 2015, vol. 38, no. 1, pp. 105–125. DOI 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- GAO, C. [et al.]. On the mechanism of constitutive Pdr1 activator-mediated PDR5 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for enhanced recruitment of coactivators and altered nucleosome structures. *Journal of Biological Chemistry*, 2004 vol. 279, no. 41, pp. 42677–42686. ISSN 00219258. DOI 10.1074/jbc.M406363200.
- GARGIS, A.S.[et al.]. Good laboratory practice for clinical next-generation sequencing informatics pipelines. *Nature Biotechnology*, 2015, vol. 33, no. 7, pp. 689–693. ISSN 15461696. DOI 10.1038/nbt.3237.
- GUPTA, N. y VERMA, V.K. Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality, 2019, pp. 313–341. DOI 10.1007/978-981-13-8844-6_15.
- HENNET, T. Diseases of glycosylation beyond classical congenital disorders of glycosylation. *Biochimica et biophysica acta*, 2012, pp. 1–12. DOI 10.1016/j.bbagen.2012.02.001.
- HUGGO CÓRDOVA PLUMA, V., VARGAS VIVEROS, P., VEGA, C., QUINTERO, M., HURTADO MONROY, R., DE REVISIÓN, A. y CIUDAD DE MÉXICO, P., 2011. Agregometría Plaquetaria: El Estudio De La Agregación De Las Plaquetas Y La Disfunción Plaquetaria. *Medicina Interna de México Volumen Med Int Mex*, vol. 2727, no. 11, pp. 58–74.
- IONEL CIUARCANU AND FRANCISC KEREK, 1984. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, vol. 131, pp. 209–217.
- JAEKEN, J. [et al.]. Phosphomannomutase deficiency is the main cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome with type I isoelectrofocusing pattern of serum sialotransferrins. *Journal of inherited metabolic disease*, 1997, vol. 20, no. 3, pp. 447–9. ISSN 0141-8955.
- JAEKEN, J. Congenital disorders of glycosylation (CDG): update and new developments. *Journal of inherited metabolic disease*, 2004, vol. 27, no. 3, pp. 423–426.
- JAEKEN, J.,. Congenital disorders of glycosylation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, vol. 1214, pp. 190–198. DOI 10.1111/j.1749-6632.2010.05840.x.
- JAEKEN, J. y PÉANNE, R.,. What is new in CDG? *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2017, pp. 1–17. ISSN 15732665. DOI 10.1007/s10545-017-0050-6.
- JEPPSSON, J., KRISTENSSON, H. Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC

- to determine heavy consumption of alcohol. *Clinical chemistry*, 1993, vol. 39, no. 10, pp. 2115-2120.
- KOBOLDT, D.C. [et al.]. The NGS revolution and its impact on genomics. *Cell*, 2013, vol. 155, no. 1, pp. 27-38. DOI 10.1016/j.cell.2013.09.006.The.
- KOLTAI, K. [et al.]. Platelet aggregometry testing: Molecular mechanisms, techniques and clinical implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, vol. 18, no. 8, pp. 1-21. ISSN 14220067. DOI 10.3390/ijms18081803.
- L.C. TEGTMEYER [et al.]. Multiple Phenotypes in Phosphoglucomutase 1 Deficiency L.C. *Mol Psychiatry.*, 2015, vol. 20, no. 6, pp. 1588-1595. DOI 10.4172/2157-7633.1000305.Improved.
- LI, L.[et al.]. Patterns and levels of platelet glycosylation in patients with coronary heart disease and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* [en línea], 2018, vol. 45, no. 1, pp. 56-65. ISSN 1573742X. DOI 10.1007/s11239-017-1573-2. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11239-017-1573-2>.
- LINSEN, M. [et al.]. Thrombotic complications in patients with PMM2-CDG. *Molecular Genetics and Metabolism* [en línea], 2013, vol. 109, no. 1, pp. 107-111. ISSN 10967192. DOI 10.1016/j.ymgme.2013.02.006.
- LOOS, F. [et al.]. Hemolytic Uremic Syndrome Attributable to. *Clinical Chemistry*, 2002, no. 5, pp. 781-784.
- MAMMADOVA-BACH, E. [et al.]. Platelets and Defective N-Glycosylation. *International journal of molecular sciences*, 2020, vol. 21, no. 16. ISSN 14220067. DOI 10.3390/ijms21165630.
- MARKLOVÁ, E., ALBAHRI, Z. Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Clinica Chimica Acta*, 2007, vol. 385, no. 1-2, pp. 6–20. DOI 10.1016/j.cca.2007.07.002.
- MARTINEZ-DUNCKER, ASTEGGIANO, C. y FREEZE, H.H. Congenital Disorders of Glycosylation. 2012, pp. 59-81.
- MATTHIJS G. [et al.]. Mutation in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nature Genetics*, 1997, vol. 15, pp. 57-61.
- MATTHIJS, G. [et al.]. Approaches to homozygosity mapping and exome sequencing for the identification of novel types of CDG. *Glycoconjugate Journal*, 2013, vol. 30, no. 1, pp. 67-76. ISSN 02820080. DOI 10.1007/s10719-012-9445-7.

- MATTHIJS, G. [et al.]. Mutations in PMM2 that cause congenital disorders of glycosylation, type Ia (CDG-Ia). *Human Mutation*, 2000, vol. 16, no. 5, pp. 386-394. ISSN 10597794. DOI 10.1002/1098-1004(200011)16:5<386::AID-HUMU2>3.0.CO;2-Y.
- METZKER, M.L. Sequencing in real time. *Nature Biotechnology*, 2009, vol. 27, no. 2, pp. 150-151. ISSN 10870156. DOI 10.1038/nbt0209-150.
- MORAVA, E. [et al.]. Quo vadis: the re-definition of “inborn metabolic diseases”. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2015, vol. 38, no. 6, pp. 1003-1006. ISSN 0141-8955. DOI 10.1007/s10545-015-9893-x.
- MORAVA, E. [et al.]. Congenital disorder of glycosylation type Ix: review of clinical spectrum and diagnostic steps. *Journal of inherited metabolic disease*, 2008, vol. 31, no. 3, pp. 450-6. DOI 10.1007/s10545-008-0822-0.
- MURAWAKI, Y. [et al.]. Serum carbohydrate-deficient transferrin in patients with nonalcoholic liver disease and with hepatocellular carcinoma. *Clinica Chimica Acta*, 1997, vol. 259, no. 1-2, pp. 97-108. ISSN 00098981. DOI 10.1016/S0009-8981(96)06473-X.
- MUZZEY, D., EVANS, E.A., LIEBER, C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Current Genetic Medicine Reports*, 2015, vol. 3, no. 4, pp. 158-165. ISSN 2167-4876. DOI 10.1007/s40142-015-0076-8.
- MYCROFT, R.H., MITCHELL, D.C., KAY, J. An evaluation of statistical procedures for comparing an individual's performance with that of a group of controls. *Cognitive Neuropsychology*, 2002, vol. 19, no. 4, pp. 291-299. ISSN 02643294. DOI 10.1080/02643290143000150.
- NG, B.G., FREEZE, H.H. Perspectives on Glycosylation and Its Congenital Disorders. *Trends in Genetics* [en línea], 2018, vol. 34, no. 6, pp. 466-476. ISSN 13624555. DOI 10.1016/j.tig.2018.03.002.
- NOELLE, V. [et al.]. Unusual presentation of congenital disorder of glycosylation type Ia: congenital persistent thrombocytopenia, hypertrophic cardiomyopathy and hydrops-like aspect due to marked peripheral oedema. *European journal of pediatrics*, 2005, vol. 164, no. 4, pp. 223–226. DOI 10.1007/s00431-004-1611-x.
- PALMIGIANO, A. [et al.]. *Chapter 5 in Alzheimer ' s Disease*. S.l.: 2018, ISBN 9781493977048.
- PAPAZOGLU, G.M.[et al.]. Mass spectrometry glycophenotype characterization of ALG2-

- CDG argentinean patients with a new genetic variant. *Glycoconjugate Journal*, 2020, En prensa.
- PARK, S.T., KIM, J. Trends in next-generation sequencing and a new era for whole genome sequencing. *International Neurolology Journal*, 2016, vol. 20, pp. 76-83. ISSN 20936931. DOI 10.5213/inj.1632742.371.
- PASCOAL, C. [et al.]. CDG and immune response: From bedside to bench and back. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2020, vol. 43, no. 1, pp. 90-124. ISSN 15732665. DOI 10.1002/jimd.12126.
- PÉANNE, R. [et al.]. Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis? *European Journal of Medical Genetics*, 2017, DOI 10.1016/j.ejmg.2017.10.012.
- PHILLIPS, D.R. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood*, 1998, vol. 71, no. 4, pp. 831-843. ISSN 0006-4971. DOI 10.1111/j.1749-6632.1987.tb30994.x.
- PIRARD, M. [et al.]. Effect of mutations found in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type IA on the activity of phosphomannomutase 2. *FEBS Letters*, 1999, vol. 452, no. 3, pp. 319-322. ISSN 00145793. DOI 10.1016/S0014-5793(99)00673-0.
- PONTÉN, F. [et al.]. A global view of protein expression in human cells, tissues, and organs. *Molecular Systems Biology*, 2009, vol. 5, no. 337, pp. 1-9. ISSN 17444292. DOI 10.1038/msb.2009.93.
- PRESTEGARDET, J.; JIAN L., y Göran. W. Oligosaccharides and Polysaccharides. *Essential of Glycobiology 3rd edition*. 2017, 3rd editio. Ne york: Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press,
- QUINTANA, E. [et al.]. Screening for congenital disorders of glycosylation (CDG): Transferrin HPLC versus isoelectric focusing (IEF). *Clinical Biochemistry* [en línea], 2009, vol. 42, no. 4-5, pp. 408-415. ISSN 00099120. DOI 10.1016/j.clinbiochem.2008.12.013.
- RANSTAM, J. Repeated measurements, bilateral observations and pseudoreplicates, why does it matter? *Osteoarthritis and Cartilage* [en línea], 2012, vol. 20, no. 6, pp. 473-475. ISSN 10634584. DOI 10.1016/j.joca.2012.02.011. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2012.02.011>.
- RENNER, F., KANITZ, R.D. Quantification of carbohydrate-deficient transferrin by ion-exchange chromatography with an enzymatically prepared calibrator. *Clinical chemistry*, 1997, vol. 43, no. 3, pp. 485-490.
- RYMEN, D., JAEKEN, J. Skin manifestations in CDG. *Journal of inherited metabolic*

- disease, 2014, vol. 37, no. 5, pp. 699-708. DOI 10.1007/s10545-014-9678-7.
- SCHELLENBERG, F., WIELDERS, J.P.M. Evaluation of capillary electrophoresis assay for CDT on SEBIA's Capillarys System: Intra and inter laboratory precision, reference interval and cut-off. *Clinica Chimica Acta* [en línea], 2010, vol. 411, no. 23-24, pp. 1888-1893. ISSN 00098981. DOI 10.1016/j.cca.2010.07.015.
- SLATKO, B.E., GARDNER, A.F., AUSUBEL, F.M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2018, vol. 122, no. 1, pp. 1-11. ISSN 19343647. DOI 10.1002/cpmb.59.
- STIBLER, H., JAEKEN, J. Carbohydrate deficient serum transferrin in a new systemic hereditary syndrome. *Arch. Dis. Child.*, 1990, vol. 65, pp. 107-11.
- STURIALE, L., BARONE, R., GAROZZO, D. The impact of mass spectrometry in the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2011, vol. 34, no. 4, pp. 891-899. ISSN 01418955. DOI 10.1007/s10545-011-9306-8.
- STURIALE, L. [et al.]. Multiplexed glycoproteomic analysis of glycosylation disorders by sequential yolk immunoglobulins immunoseparation and MALDI-TOF MS. *Proteomics*, 2008, vol. 8, no. 18, pp. 3822-3832. ISSN 16159853. DOI 10.1002/pmic.200700496.
- STURIALE, L. [et al.]. ALG12-CDG: novel glycophenotype insights endorse the molecular defect. *Glycoconjugate Journal*, 2019, ISSN 15734986. DOI 10.1007/s10719-019-09890-2.
- THIEL, C. [et al.]. A new type of congenital disorders of glycosylation (CDG-Ii) provides new insights into the early steps of dolichol-linked oligosaccharide biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no. 25, pp. 22498-22505. ISSN 00219258. DOI 10.1074/jbc.M302850200.
- VAN GEET, C. [et al.]. Congenital disorders of glycosylation type Ia and IIa are associated with different primary haemostatic complications. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2011, vol. 34, no. 4, pp. 477-492. ISSN 01418955. DOI 10.1023/A:1010581613821.
- VEGA, A.I. [et al.]. Expression analysis revealing destabilizing mutations in phosphomannomutase 2 deficiency (PMM2-CDG): Expression analysis of PMM2-CDG mutations. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2011, vol. 34, no. 4, pp. 929-939. ISSN 01418955. DOI 10.1007/s10545-011-9328-2.

- VOGT, G. [et al.]. Gain-of-glycosylation mutations. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2007, vol. 17, no. 3, pp. 245-251. ISSN 0959437X. DOI 10.1016/j.gde.2007.04.008.
- VUILLAUMIER-BARROT S. [et al.]. Mutation and Polymorphism Report. *Cell Research*, 2000, vol. 141, pp. 5-7.
- WOPEREIS, S. [et al.]. Apolipoprotein C-III Isofocusing in the Diagnosis of Genetic Defects in O-Glycan Biosynthesis. *Clin. Chem.*, 2003, vol. 49, pp. 1839–184.
- YOHE, S., THYAGARAJAN, B. Review of clinical next-generation sequencing. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 2017, vol. 141, no. 11, pp. 1544-1557. ISSN 15432165. DOI 10.5858/arpa.2016-0501-RA.
- YUSTE-CHECA, P. [et al.]. The Effects of PMM2-CDG-Causing Mutations on the Folding, Activity, and Stability of the PMM2 Protein. *Human Mutation*, 2015, vol. 36, no. 9, pp. 851-860. ISSN 10981004. DOI 10.1002/humu.22817.
- ZHANG, W. [et al.]. A novel N-tetrasaccharide in patients with congenital disorders of glycosylation, including asparagine-linked glycosylation protein 1, phosphomannomutase 2, and mannose phosphate isomerase deficiencies. *Clinical Chemistry*, 2016, vol. 62, no. 1, pp. 208-217. ISSN 15308561. DOI 10.1373/clinchem.2015.243279.
- ZÜHLSDORF, A. [et al.]. Transferrin variants: Pitfalls in the diagnostics of Congenital disorders of glycosylation. *Clinical Biochemistry*, 2014, vol. 48, no. 1-2, pp. 11-13. DOI 10.1016/j.clinbiochem.2014.09.022.